

**Untersuchung zur
Wirkung natürlicher Liganden
des 'aryl hydrocarbon'-Rezeptors (AhR)**

vom Fachbereich Chemie der Technischen Universität Kaiserslautern
zur Verleihung des akademischen Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“ genehmigte

Dissertation

(D 386)

vorgelegt von
Diplom-Chemikerin
Annette Baumgart

Betreuer der Arbeit: Prof. Dr. Dr. Schrenk
Kaiserslautern 2004

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 14.12.04

Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. S. Ernst

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. D. Schrenk

2. Berichterstatter: Prof. Dr. G. Eisenbrand

Der experimentelle Teil dieser Arbeit wurde im Fachbereich Chemie, Fachrichtung Lebensmittelchemie und Umwelttoxikologie der Universität Kaiserslautern im Arbeitskreis von Prof. Dr. Dr. D. Schrenk zwischen Februar 2000 und Juli 2004 durchgeführt.

DANKSAGUNGEN

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. D. Schrenk nicht nur für die Überlassung des sehr interessanten Themas, sondern auch für den mir gewährten Freiraum bei der Durchführung und Gestaltung der Arbeit, sowie seine stete Diskussionsbereitschaft und seine Unterstützung bei neuen Entwicklungen während meiner gesamten Promotionszeit.

Dr. Hans-Joachim Schmitz möchte ich besonders herzlich danken für die vielen interessanten und thematisch weitgefächerten Diskussionen, seine guten Ratschläge und seine stete Hilfsbereitschaft, wenn die Technik mal wieder versagte. Außerdem bedanke ich mich für ein jahrelanges harmonisches und freundschaftliches Zusammenleben im Büro, wo ich meine dekorativen Ambitionen (fast) immer frei ausleben konnte.

Mein ganz besonderer Dank gilt Dr. Silke Conrad und Dr. Judith Racky für ihre Freundschaft, die nicht nur im Labor nutzbringende und humorvolle Zusammenarbeit und ihre Fähigkeit, Probleme auf kreative Weise anzugehen. Auch möchte ich mich für ihre immerwährende Unterstützung und Ermutigung während der letzten Jahre bedanken.

Bei Dr. Hans-Martin Kauffmann möchte ich mich für seine unabhängig von der Tageszeit und dem Aufenthaltsort immerwährende Unterstützung und Diskussionsbereitschaft, sowie seine hilfreichen Ratschläge bedanken.

Bei Melanie Schmidt bedanke ich mich für eine schöne und humorvolle Zeit bei der Arbeit und auch darüber hinaus, ihre Hilfsbereitschaft bei der Überlebenssicherung der Zellen sowie für neue tiefgreifende Erkenntnisse, wie man ein Haus baut.

Monika Groß und Susanne Kunz sowie allen anderen beteiligten Kollegen danke ich für die Präparation der primären Rattenhepatozyten.

Des Weiteren möchte ich mich bei Wilhelmine Daub und Monika Groß für ihre hervorragende technische Assistenz und ihren kreativen Geist beim Beschriften von Epis bedanken.

Bei Dr. Ragna Hussong bedanke ich mich für die jahrelange gute Zusammenarbeit und die Bereitstellung des Reporter-genplasmids.

Anita Strohauer gebührt mein Dank für ihren steten Einsatz bei organisatorischen und beinahe historischen Fragen Papiere und Ordner zu durchsuchen und das Gesuchte auch immer zu finden, sowie ihre fröhliche Art, die manchen trüben Tag erheiterte.

Bei Prof. Petersen, Universität von Illinois (USA), möchte ich mich für die Bereitstellung des Furocumarins DHB bedanken.

Prof. Dr. Maurer und seinen Mitarbeitern von den Universitätskliniken des Saarlandes (Homburg) danke ich für die LC-MS-Messungen einiger Fermentationsproben.

Ich danke dem Arbeitskreis von Prof. Dr. Marko und hier insbesondere Michael Habermeyer für die Unterstützung bei der Durchführung der Topoisomerase-Untersuchungen.

Bei allen nicht genannten Kollegen und Kolleginnen der Arbeitsgruppe Schrenk, sowie der Arbeitskreise von Prof. Dr. Anke, Prof. Dr. Marko, Prof. Dr. Eisenbrand und Prof. Dr. Trommer -insbesondere aus Bau 56- möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit und die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre bedanken. Mir werden die gemeinsamen Such- und Find- Aktionen, sowie die Identifizierungen möglicher nützlicher Geräte und deren einstigem Zweck immer in Erinnerung bleiben.

Stefan Opperskalski danke ich herzlich für seinen hingebungsvollen und nächtelangen Einsatz am Computer, um ihn dazu zu bewegen, diese Arbeit zu drucken, und meiner Freundin Kerstin für ihre moralische und Schokoladen-haltige Unterstützung bei diesen Aktionen.

Meiner Familie und Freunden danke ich für ihre immerwährende liebevolle Ermutigung und Unterstützung in allen Lebensbereichen über die Studien- und Promotionszeit hinweg.

Diese Arbeit wurde finanziert durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG).

Für meine Eltern und Freunde

*Das Höchste,
wozu der Mensch gelangen kann,
ist das Erstaunen.*

Johann Wolfgang von Goethe

VERÖFFENTLICHUNGEN UND KONGRESSBEITRÄGE AUS DIESER ARBEIT

Baumgart A, Schmidt M, Schmitz H.-J, Schrenk D. Inhibition of CYP1A-isoenzymes by furocoumarines in rat hepatocytes, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **363**(4) (2001): Suppl. R134

Baumgart A, Schmidt M, Schmitz H.-J, Schrenk D. Inhibition von CYP1A-Isoenzymen durch Furocoumarine in primären Rattenhepatozyten, SKLM-Tagung, Kaiserslautern. (2001)

Baumgart A, Schmidt M, Schmitz H.-J, Schrenk D. Furocoumarines as inhibitors and inducers of Ah-Receptor regulated CYP1A activity, *Organohalogen Compounds* (2001) **56**: 9-12.

Baumgart A, Schmidt M, Schmitz H.-J, Schrenk D. Einfluss von Lebensmittelinhaltsstoffen auf Cytochrom P 450 Isoenzyme, SKLM-Tagung, Saarbrücken. (2002)

Baumgart A, Schmidt M, Schmitz H.-J, Schrenk D. Influence of food constituents on cytochrome P450 1A activity, DFG-Symposiumsreihe "Functional Food: Safety aspects", Wiley VCH Verlag GmbH, Weinheim (2003):351-354.

Baumgart A, Mayser P, Krämer H.-J, Thoma W., Monsees T, Wille G, Polborn K, Steglich W, Schrenk D, Schmitz H.-J. Tryptophan metabolites isolated from a dermal yeast act as Dioxin-Receptor agonists, ISTRY-Kongress, Padua, Italy. (2002)

Baumgart A, Schmidt M, Schmitz H.-J, Schrenk D. Influence of natural furocoumarines on Ah-Receptor regulated CYP1A activity, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* (2003) **367**(1): Suppl. R125

Schädlich I, Baumgart A, Schmitz H.-J, Schrenk D. Microbiological metabolites derived from tryptophan as CYP1A-inducers, *Organohalogen Compounds* (2003) 60-5

Baumgart A, Schmidt M, Schmitz H.-J, Schrenk D. Interactions of natural food constituents with the aryl hydrocarbon (Ah) receptor, *The Toxicologist* (2004) **78** (I-S)

Baumgart A, Schmidt M, Schmitz H.-J, Schrenk D. Natural furocoumarins as inducers and inhibitors of cytochrome P450 1A1 in rat hepatocytes, *Biochem Pharmacol.* (2005), **69**:657-67

INHALTSVERZEICHNIS

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 1 | EINLEITUNG | 1 |
| 1.1 | ARYL HYDROCARBON RECEPTOR (AhR) | 1 |
| 1.1.1 | <i>Allgemein.....</i> | <i>1</i> |
| 1.1.2 | <i>Struktur des AhR.....</i> | <i>2</i> |
| 1.1.3 | <i>AhR-Signaltransduktion</i> | <i>3</i> |
| 1.1.4 | <i>AhR- Genbatterie</i> | <i>5</i> |
| 1.2 | CYP1A1 | 6 |
| 1.2.1 | Cytochrom P450 | 7 |
| 1.2.2 | CYP1A Familie | 7 |
| 1.2.3 | Regulation des CYP1A1 | 8 |
| 1.2.3.1 | Ligand-induzierte Regulation | 8 |
| 1.2.3.2 | Ligand-unabhängige Aktivierung des CYP1A1 | 8 |
| 1.3 | LIGANDEN DES AhR UND CYP1A1 | 9 |
| 1.3.1 | <i>‘Klassische’ exogene Liganden</i> | <i>10</i> |
| 1.3.2 | <i>Natürliche Liganden</i> | <i>13</i> |
| 1.3.2.1 | Exogene Liganden..... | 13 |
| 1.3.2.2 | Endogene Liganden..... | 15 |
| 1.3.2.2.1 | Indole | 16 |
| 1.3.2.2.2 | Tetrapyrole | 17 |
| 1.3.2.2.3 | Arachidonsäuremetabolite | 17 |
| 1.3.2.2.4 | Weitere Liganden | 18 |
| 1.4 | FUROCUMARINE | 18 |
| 1.4.1 | <i>Photochemische Eigenschaften</i> | <i>20</i> |
| 1.4.2 | <i>PUVA-Therapie</i> | <i>21</i> |
| 1.4.3 | <i>Toxizität, Mutagenität und Kanzerogenität.....</i> | <i>22</i> |
| 1.4.3.1 | Ohne Lichteinfluss | 22 |
| 1.4.3.2 | Phototoxizität, Photomutagenität und Kanzerogenität..... | 22 |
| 1.4.4 | <i>Interaktionen mit Enzymsystemen.....</i> | <i>23</i> |
| 1.5 | AUFGABENSTELLUNG | 25 |
| 2 | MATERIAL UND METHODEN..... | 27 |
| 2.1 | MATERIALIEN..... | 27 |

| | | |
|-----------|--|----|
| 2.1.1 | <i>Zellen</i> | 27 |
| 2.1.1.1 | H4IIE-Zelllinie..... | 27 |
| 2.1.1.2 | Versuchstiere..... | 27 |
| 2.1.2 | <i>Chemikalien und Reagenzsysteme</i> | 27 |
| 2.1.3 | <i>Lösungen</i> | 32 |
| 2.1.3.1 | Perfusionslösungen für Primärhepatozyten | 32 |
| 2.1.3.2 | Nährmedien..... | 33 |
| 2.1.3.2.1 | Kulturmedien für Zellen | 33 |
| 2.1.3.2.2 | Kulturmedien für Bakterienkulturen | 34 |
| 2.1.3.3 | Lösungen für EROD-Assay | 35 |
| 2.1.3.4 | Zytotoxizitätstests | 37 |
| 2.1.3.5 | Lösungen zur Proteinbestimmung..... | 38 |
| 2.1.3.6 | RNA-Isolierung..... | 38 |
| 2.1.3.7 | Transfektion von Plasmiden | 39 |
| 2.1.3.8 | Lösungen für Kernextrakt-Gewinnung und EMSA | 39 |
| 2.1.3.9 | Proteinisolierung und Western Blot | 42 |
| 2.1.3.10 | RT-PCR | 46 |
| 2.1.3.11 | Topoisomerase-Assays | 46 |
| 2.1.3.12 | Fermentationslösungen..... | 47 |
| 2.1.4 | <i>Geräte und Materialien</i> | 47 |
| 2.2 | METHODEN | 50 |
| 2.2.1 | <i>Zellkultur</i> | 50 |
| 2.2.1.1 | Kollagenbeschichtung der Kulturflächen | 50 |
| 2.2.1.2 | Kultivierung und Passagierung von Zelllinien | 51 |
| 2.2.1.3 | Einfrieren von Zellen..... | 51 |
| 2.2.1.4 | Auftauen von Zellen..... | 51 |
| 2.2.2 | <i>Präparation von Rattenhepatozyten</i> | 51 |
| 2.2.2.1 | Durchführung der Leberperfusion..... | 51 |
| 2.2.2.2 | Zellzahlbestimmung | 53 |
| 2.2.2.3 | Vitalitätsbestimmung..... | 53 |
| 2.2.2.4 | Kultivierung | 54 |
| 2.2.3 | <i>Zellbehandlung</i> | 54 |
| 2.2.3.1 | Allgemein | 54 |
| 2.2.3.2 | Inkubation mit mehreren Substanzen | 56 |

| | | |
|-----------|---|----|
| 2.2.4 | <i>Zellernte</i> | 56 |
| 2.2.4.1 | EROD-Assay..... | 56 |
| 2.2.4.1.1 | Nach Seglen | 56 |
| 2.2.4.1.2 | Nach Kennedy | 56 |
| 2.2.4.2 | Mikrosomengewinnung | 56 |
| 2.2.4.3 | RNA-Isolierung..... | 57 |
| 2.2.4.4 | LDH-Assay | 58 |
| 2.2.5 | <i>Bestimmung der 7-Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD)-Aktivität</i> | 58 |
| 2.2.5.1 | Prinzip der Reaktion..... | 58 |
| 2.2.5.2 | Modifizierte Methode nach Seglen | 59 |
| 2.2.5.2.1 | Durchführung für Gesamthomogenat..... | 59 |
| 2.2.5.2.2 | Durchführung für Mikrosomen..... | 60 |
| 2.2.5.2.3 | Proteinbestimmung nach Lowry | 60 |
| 2.2.5.3 | Methode nach Kennedy | 61 |
| 2.2.5.3.1 | Durchführung für 48 Well-Platten | 61 |
| 2.2.5.3.2 | Durchführung für Homogenat- und Mikrosomenproben | 62 |
| 2.2.5.4 | Methode nach Donato..... | 63 |
| 2.2.6 | <i>Zytotoxizitätstests</i> | 63 |
| 2.2.6.1 | LDH-Assay | 63 |
| 2.2.6.2 | MTT-Test..... | 64 |
| 2.2.7 | <i>Transfektion von H4IIE-Zellen mit einem Reportergenplasmid</i> | 65 |
| 2.2.7.1 | Herstellung Kalziumchlorid-kompetenter Bakterien | 65 |
| 2.2.7.2 | Transformation eines Reportergenplasmids in kompetente Bakterien..... | 65 |
| 2.2.7.3 | Gewinnung der Plasmide..... | 66 |
| 2.2.7.4 | Durchführung der Transfektion | 66 |
| 2.2.8 | <i>Reportergen-Assay</i> | 67 |
| 2.2.9 | <i>Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)</i> | 68 |
| 2.2.9.1 | Kernextraktgewinnung | 69 |
| 2.2.9.2 | Oligonukleotid-Sonden..... | 69 |
| 2.2.9.2.1 | Hybridisierung..... | 70 |
| 2.2.9.2.2 | Radioaktive Markierung der Oligonukleotide | 70 |
| 2.2.9.3 | Durchführung des EMSA | 71 |
| 2.2.10 | <i>Western Blot Analyse</i> | 72 |
| 2.2.10.1 | Proteinisolierung | 72 |

| | | |
|------------|---|-----------|
| 2.2.10.2 | Bestimmung der Proteinkonzentration | 72 |
| 2.2.10.3 | SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page) | 72 |
| 2.2.10.4 | Western Blotting | 73 |
| 2.2.10.5 | Immunologische Detektion..... | 73 |
| 2.2.10.5.1 | Antikörperinkubation..... | 73 |
| 2.2.10.5.2 | Detektion mit dem Enhanced Chemiluminescence (ECL)-Verfahren | 74 |
| 2.2.11 | <i>RT-PCR</i> | 74 |
| 2.2.11.1 | Reverse Transkription | 74 |
| 2.2.11.2 | PCR-Reaktion | 75 |
| 2.2.12 | <i>Real time PCR</i> | 76 |
| 2.2.13 | <i>Topoisomerase-Assays</i> | 79 |
| 2.2.13.1 | Relaxationsassay (Topoisomerase I) | 79 |
| 2.2.13.2 | Decatenierungsassay (Topoisomerase II) | 80 |
| 2.2.14 | <i>Analyse von Bakterienkulturen aus Rattenfeces mit Tryptophan</i> | 81 |
| 2.2.14.1 | Fermentation | 82 |
| 2.2.14.2 | Aufreinigung | 83 |
| 2.2.14.3 | Extraktion | 84 |
| 2.2.14.4 | Festphasenextraktion | 84 |
| 2.2.15 | <i>‘High pressure liquid chromatography’ (HPLC)</i> | 84 |
| 2.2.15.1 | Probenvorbereitung | 85 |
| 2.2.15.2 | Messmethoden | 85 |
| 2.2.15.3 | Fraktionierung | 86 |
| 2.2.16 | <i>Statistik</i> | 86 |
| 3 | ERGEBNISSE UND DISKUSSION | 87 |
| 3.1 | FUROCUMARINE | 87 |
| 3.1.1 | <i>Einfluss der Furocumarine auf die EROD-Aktivität</i> | 88 |
| 3.1.1.1 | EROD-Aktivität in Furocumarin-inkubierten primären Rattenhepatozyten | 88 |
| 3.1.1.2 | EROD-Aktivität bei Koinkubation mit TCDD | 90 |
| 3.1.2 | <i>Expressionsanalyse</i> | 96 |
| 3.1.2.1 | Expressionsanalyse mittels RT-PCR..... | 96 |
| 3.1.2.2 | Expressionsanalyse mittels real time PCR | 99 |
| 3.1.3 | <i>Western-Blot-Analyse</i> | 102 |
| 3.1.4 | <i>Reportergenuntersuchungen</i> | 106 |
| 3.1.5 | <i>Gelshiftexperimente</i> | 109 |

| | | |
|---------|--|-----|
| 3.1.6 | <i>Zytotoxizität</i> | 110 |
| 3.1.7 | <i>6',7'-Dihydroxybergamottin</i> | 112 |
| 3.1.7.1 | Western Blot Analyse | 112 |
| 3.1.7.2 | Reportergenuntersuchungen | 113 |
| 3.1.8 | <i>Inhibition der Topoisomerase-Aktivität durch Furocumarine</i> | 114 |
| 3.1.8.1 | Topoisomerase I..... | 114 |
| 3.1.8.2 | Topoisomerase II..... | 116 |
| 3.1.9 | <i>Abschließende Diskussion</i> | 118 |
| 3.2 | AHR-LIGANDEN AUS FERMENTATIONEN MIT BAKTERIENKULTUREN AUS RATTENFECES | 122 |
| 3.2.1 | <i>Vorbefunde</i> | 122 |
| 3.2.2 | <i>Grundlegendes Verfahren</i> | 122 |
| 3.2.3 | <i>Aufreinigung</i> | 123 |
| 3.2.4 | <i>Extraktion</i> | 123 |
| 3.2.5 | <i>Analyse der aus der Festphasenextraktion gewonnenen Produkte</i> | 125 |
| 3.2.6 | <i>Zytotoxizität</i> | 126 |
| 3.2.7 | <i>HPLC-Analyse der Extrakte</i> | 127 |
| 3.2.8 | <i>Analyse der EROD-Aktivität nach HPLC Fraktionierung</i> | 128 |
| 3.2.8.1 | Verwendete Extrakte | 128 |
| 3.2.8.2 | Fraktionierung | 129 |
| 3.2.9 | <i>EROD-Aktivität von Fermentationsansätzen mit selektierten Bakterienkulturen</i> | 132 |
| 4 | ZUSAMMENFASSUNG | 135 |
| 5 | LITERATUR | 138 |
| 6 | LEBENS LAUF | 174 |

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

| | |
|---|-----|
| Abbildung 1.1: Struktur des AhR | 2 |
| Abbildung 1.2: Modell des AhR-Signaltransduktionsweges | 4 |
| Abbildung 1.3: Strukturen von 'klassischen' AhR-Liganden..... | 11 |
| Abbildung 1.4: Nicht 'klassische' Liganden des AhR | 12 |
| Abbildung 1.5: Natürliche exogene und endogene AhR-Liganden, gebildet aus Tryptophan | 13 |
| Abbildung 1.6: Weitere natürliche und endogene Liganden des AhR | 16 |
| Abbildung 2.1: Oxidative Dealkylierung von Ethoxyresorufin zu Resorufin | 58 |
| Abbildung 2.2: Reaktion von Fluorescamin mit Protein | 62 |
| Abbildung 2.3: Oxidation von Pyruvat zu Laktat durch LDH..... | 64 |
| Abbildung 2.4: Reaktionen der Luciferasen | 68 |
| Abbildung 3.1: Strukturen der Furocumarine..... | 87 |
| Abbildung 3.2: EROD-Aktivität von bei Licht mit Furocumarin inkubierten primären Rattenhepatozyten | 89 |
| Abbildung 3.3: EROD-Aktivität von in Dunkelheit mit Furocumarin inkubierten primären Rattenhepatozyten | 90 |
| Abbildung 3.4: Inhibition der EROD-Aktivität durch Furocumarine | 91 |
| Abbildung 3.5: repräsentative RT-PCR von Furocumarin inkubierten Primärhepatozyten bei Licht .. | 97 |
| Abbildung 3.6: CYP1A1 mRNA Expression der RT-PCR von Furocumarin inkubierten Primärhepatozyten bei Licht | 98 |
| Abbildung 3.7: Validierung der Primer für die real time PCR | 99 |
| Abbildung 3.8: CYP1A1 mRNA Expression von Furocumarin inkubierten Rattenhepatozyten unter Lichteinfluss | 100 |
| Abbildung 3.9: CYP1A1 mRNA Expression von Furocumarin inkubierten Rattenhepatozyten unter Lichtausschluss..... | 101 |
| Abbildung 3.10: Western Blots mit Protein aus bei Licht mit Furocumarin inkubierten Primärhepatozyten | 102 |
| Abbildung 3.11: CYP1A1 Proteinexpression aus bei Licht mit Furocumarin inkubierten Primärhepatozyten | 103 |
| Abbildung 3.12: Western Blots mit Protein aus bei Lichtausschluss mit Furocumarin inkubierten Primärhepatozyten | 104 |
| Abbildung 3.13: CYP1A1 Proteinexpression aus bei Lichtausschluss mit Furocumarin inkubierten Primärhepatozyten | 105 |
| Abbildung 3.14: Reportergenaktivität des pGL3-XRE in H4IIE-Zellen nach Behandlung mit 100 µM Furocumarin unter Licht | 107 |

| | |
|--|-----|
| Abbildung 3.15: Reportergenaktivität des pGL3-XRE in H4IIE-Zellen nach Behandlung mit 100 µM Furocumarin unter Lichtausschluss | 108 |
| Abbildung 3.16: EMSA mit Kernextrakt aus Furocumarin (100 µM) inkubierten H4IIE-Zellen | 110 |
| Abbildung 3.17: LDH-Leakage von mit Furocumarin inkubierten Rattenhepatozyten | 111 |
| Abbildung 3.18: Western Blot mit Gesamthomogenat aus DHB (100 µM) inkubierten Primärhepatozyten bei unterschiedlichen Lichtverhältnissen | 112 |
| Abbildung 3.19: Reportergenaktivität des pGL3-XRE in H4IIE-Zellen nach Behandlung mit 100 µM DHB | 113 |
| Abbildung 3.20: Inhibition der Topoisomerase I Aktivität bei Licht..... | 114 |
| Abbildung 3.21: Inhibition der Topoisomerase I Aktivität bei unterschiedlichen Lichtverhältnissen | 115 |
| Abbildung 3.22: Inhibition der Topoisomerase I Aktivität durch 8-MOP unter Lichtausschluss | 116 |
| Abbildung 3.23: Inhibition der Topoisomerase II α Aktivität..... | 117 |
| Abbildung 3.24: Inhibition der Topoisomerase II β Aktivität..... | 117 |
| Abbildung 3.25: Verfahrensschema zur Gewinnung von Tryptophan-Metaboliten | 122 |
| Abbildung 3.26: EROD-Aktivität in primären Rattenhepatozyten nach Inkubation mit Extrakten ... | 124 |
| Abbildung 3.27: MTT-Assay von mit Extrakt inkubierten Primärhepatozyten | 126 |
| Abbildung 3.28: LDH-Leakage von mit Extrakten inkubierten Primärhepatozyten | 127 |
| Abbildung 3.29: EROD-Aktivität in H4IIE-Zellen, inkubiert mit Extrakt und Verdünnungen | 129 |
| Abbildung 3.30: Repräsentatives HPLC-Chromatogramm eines Extrakts..... | 130 |
| Abbildung 3.31: EROD-Aktivität von H4IIE-Zellen, inkubiert mit Rohextrakt und HPLC-Fractionen | 131 |
| Abbildung 3.32: EROD-Aktivität von H4IIE-Zellen inkubiert mit Extrakten und deren Verdünnungen aus unterschiedlichen Fermentationsansätzen | 133 |

TABELLENVERZEICHNIS

| | |
|---|----|
| Tabelle 1.1: Struktur und Bezeichnung von Furocumarinen..... | 18 |
| Tabelle 2.1: Alphabetische Auflistung von Chemikalien*, Reagenzsystemen und kompetenten Zellen | 27 |
| Tabelle 2.2: Polyacrylamidgele für EMSA | 41 |
| Tabelle 2.3: Polyacrylamidgele für Western Blot..... | 44 |
| Tabelle 2.4: Polyacrylamidgele für Western Blot..... | 45 |
| Tabelle 2.5: Polyacrylamidgele für RT-PCR..... | 46 |
| Tabelle 2.6: Verwendete Materialien und Geräte | 47 |
| Tabelle 2.7: Zellkulturbedingungen für primäre Rattenhepatozyten | 54 |
| Tabelle 2.8: Inkubationsansätze und zugehörige Methoden..... | 55 |
| Tabelle 2.9: Verwendete Primer und Bezeichnung..... | 69 |
| Tabelle 2.10: Ansätze für EMSA..... | 71 |
| Tabelle 2.11: RT-Ansatz | 74 |
| Tabelle 2.12: RT-Programm..... | 74 |
| Tabelle 2.13: PCR-Ansatz pro Probe | 75 |
| Tabelle 2.14: PCR-Temperaturprogramm..... | 76 |
| Tabelle 2.15: RT-Temperaturprogramm | 77 |
| Tabelle 2.16: PCR-Programm | 78 |
| Tabelle 2.17: Reaktionsansatz pro Probe | 79 |
| Tabelle 2.18: Reaktionsansatz pro Probe | 80 |
| Tabelle 2.19: Zusammensetzung der Fermentationsansätze..... | 82 |
| Tabelle 2.20: Verwendete HPLC-Methoden | 85 |
| Tabelle 3.1: IC ₅₀ -Werte [µM] der EROD-Aktivität bei Koinkubation von TCDD mit den Furocumarinen in Hepatozyten und der Präinkubation von Mikrosomen bei Licht und Lichtausschluss (LA) | 91 |

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

| | |
|-------|---|
| 5-MOP | 5-Methoxypsoralen |
| 8-MOP | 8-Methoxypsoralen |
| Ah | aryl hydrocarbon |
| AHH | aryl hydrocarbon hydroxylase |
| AhR | aryl hydrocarbon receptor |
| AHRE | aryl hydrocarbon responsive element |
| AhRR | aryl hydrocarbon receptor repressor |
| AIP | AhR-interacting protein |
| ALDH3 | Aldehyd-3-dehydrogenase |
| APS | Ammoniumperoxosulfat |
| ARA9 | AhR associated protein 9 |
| ARNT | aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| B[a]P | Benzo[a]pyren |
| bHLH | basic helix-loop-helix |
| bp | Basenpaare |
| BSA | Rinderserumalbumin |
| C | Celsius |
| cDNA | komplementäre DNA |
| CYP | Cytochrom P450 |
| DC | Dicumarol |
| DEPC | Diethylpyrocarbonat |
| DHB | 6',7'-Dihydroxybergamottin |
| DIM | 3,3'-Diinolylmethan |
| DMBA | 7,12-Dimethylbenz[a]anthracene |
| DMEM | Dulbecco's modified essential medium |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| DRE | Dioxin responsive element |
| DTT | Dithiothreitol |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| EMSA | elektrophoretic mobility shift assay |
| ER | Ethoxyresorufin |
| EROD | 7-Ethoxyresorufin-O-deethylase |
| FICZ | 6-Formyl-indol[3,2-b]-carbazol |
| FKS | fötales Kälberserum |
| For | Forward |
| GAPDH | Glyzerin-3-phosphat-dehydrogenase |
| GR | Glucocorticoidrezeptor |
| h | Stunde |
| HAK | halogenierte aromatische Kohlenwasserstoffe |
| HEPES | 4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure |
| HPLC | high pressure liquid chromatography |
| hsp90 | heat shock protein 90 |
| I3C | Indol-3-carbinol |
| ICZ | Indol[3,2-b]-carbazol |
| IDH | Isocitratdehydrogenase |
| IL | Interleukin |

| | |
|--------------|---|
| KG | Körpergewicht |
| LB (-Medium) | Luria Bertani |
| LDH | Lactatdehydrogenase |
| M | molar |
| min | Minute |
| mRNA | messenger RNA |
| MTT | (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl)- Tetrazoliumbromid |
| NADH | Nicotinamidadenindinukleotid |
| NADPH | Nicotinamidadenindinukleotidphosphat |
| NES | nuclear export signal |
| NLS | nuclear localisation signal |
| NRE | negative regulatory element |
| PAI-2 | plasminogen activator inhibitor 2 |
| PAK | polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe |
| PAS | Per/ARNT/Sim |
| PBS | Phosphate buffert saline |
| PCB | polychlorierte Biphenyle |
| PCDD | polychlorierte Dibenzo-p-dioxine |
| PCDF | polychlorierte Dibenzofurane |
| PCR | polymerase chain reaction |
| Per | period |
| PKC | Proteinkinase C |
| PMSF | Phenylmethylsulfonylfluorid |
| PUVA | Psoralen-UVA |
| Rev | Reverse |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| Rpm | revolutions per minute |
| RR | Retinoidrezeptor |
| RT | reverse Transkription |
| SDS | Na-dodecylsulfat |
| Sim | single minded |
| TCDD | 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-p-dioxin |
| TEMED | N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin |
| TGF | transforming growth factor |
| Tris | Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan |
| u | units |
| UV | Ultraviolett |
| XAP2 | hepatitis B virus X-associated protein 2 |
| XRE | xenobiotic responsive element |

1 EINLEITUNG

1.1 Aryl hydrocarbon receptor (AhR)

1.1.1 Allgemein

Lebewesen sind ständig einer Vielzahl von Fremdstoffen aus unterschiedlichsten Quellen ausgesetzt wie z.B. Pflanzenmetaboliten, Mykotoxinen, Pharmazeutika und Umweltkontaminanten. Die Induktion fremdstoffmetabolisierender Enzyme dient als adaptive Antwort auf diese Exposition zur Minimierung der toxikologischen Effekte auf den Organismus.

Ende der Fünfziger Jahre zeigten Experimente in Nagern, dass die Verabreichung von polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen (PAKs) (z.B. Benzo[a]anthracen, 3-Methylcholanthren oder Benzo[a]pyren) zu einer Induktion hepatischer mikrosomaler Enzyme, bezeichnet als aryl hydrocarbon hydroxylase (AHH), führt. Die Stärke der resultierenden Enzymaktivität war in verschiedenen Mausstämmen unterschiedlich. Kreuzungsexperimente zwischen aryl hydrocarbon (Ah)-sensitiven und Ah-nichtsensitiven Mäusen und die Verwendung von 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-p-dioxin (TCDD) als äußerst potentem Agonisten der Enzyminduktion führten zur Hypothese, dass ein Ligand-abhängiger Rezeptor für die 'aryl hydrocarbon responsiveness' verantwortlich ist. Poland et al. konnten den Ah- oder Dioxin-Rezeptor (AhR) 1976 über Untersuchungen unter Verwendung von radioaktiv markiertem TCDD nachweisen (Poland et al., 1976). Die Isolierung und Aufreinigung erfolgte 1991 durch Photoaffinitätslabeling mit [¹²⁵I]2-Azido-3-iodo-7-8-dibromdibenzo-p-dioxin. (Bradfield et al., 1991; Denison et al., 1988; Gielen et al., 1972; Nebert et al., 2000; Hahn, 1998; Hankinson, 1995; Okey et al., 1994; Poland et al., 1986; Poellinger et al., 1982)

Weitergehende genetische und Struktur-Aktivitäts-Untersuchungen führten zu Identifizierung des AhR als Ligand-aktiviertem Transkriptionsfaktor, der durch Aktivierung einer Vielzahl von Genen die toxikologischen und biologischen Effekte seiner Liganden verursacht. Des Weiteren spielt er auch eine wichtige Rolle für die Zelldifferenzierung und das Zellwachstum. Außerdem ist der AhR involviert in die Regulation anderer Signaltransduktionswege z.B. Aktivierung zellulärer Prozesse als Antwort auf oxidativen Stress. (Dalton et al., 2002; Nie et al., 2001; Safe, 2001; Safe et al., 2000)

Der AhR wird in vielen Geweben unterschiedlich stark exprimiert unter anderem Lunge, Leber, Thymus und Testes. Seine Sensitivität gegenüber Liganden ist Spezies-abhängig. Polymorphismen des AhR und seiner Genbatterie können Einfluss auf eine Vielzahl physiologischer Prozesse und toxischer Effekte von Xenobiotika nehmen und damit eventuell eine Rolle in der Kanzerogenese spielen. (Anttila et al., 2001; Carver et al., 1994; Cauchi et al., 2001; Bartsch et al., 2000; Hahn, 1998; Harper et al., 2002; Hayashi et al., 1994; Nebert et al., 2004; Nebert und McKinnon, 1994; Racky et al., 2004; Schrenk, 1998; Schrenk et al., 1997 und 1998)

1.1.2 Struktur des AhR

Nach Isolation des gelabelten AhR konnte die cDNA gewonnen und die Aminosäuresequenz bestimmt werden. Der AhR sowie die mit ihm verwandten und in der Signaltransduktionskette zusammenwirkenden Proteine 'aryl hydrocarbon receptor repressor' (AhRR) und 'aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator' (ARNT), gehören zur Familie der basic helix-loop-helix (bHLH)-PAS Transkriptionsfaktoren. Die Bezeichnung PAS Domäne leitet sich von 'period' (Per), AhR/ARNT und 'single minded' (Sim) ab. Per und Sim sind strukturell homologe und nah verwandte Proteine zum AhR aus *Drosophila*. (Whitlock, 1999)

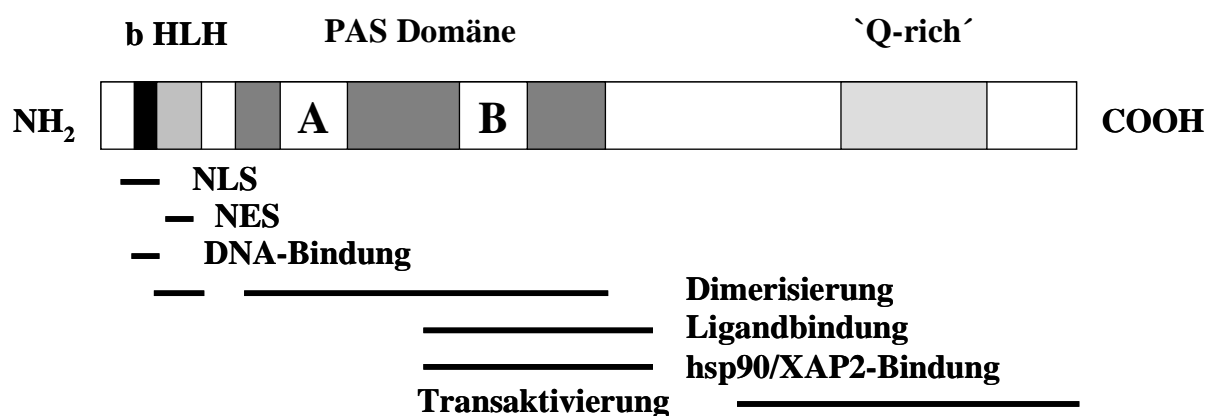


Abbildung 1.1: Struktur des AhR

Nahe des N-terminalen Endes des AhR liegt die bHLH Domäne. Die 'basic' (b) Region führt zur DNA-Bindung, während die HLH Domäne für Protein/Protein Dimerisierungen verant-

wortlich ist. Am N-Terminus ist des Weiteren ein Bereich zu finden, der sowohl ein 'AhR nuclear translocation signal' (NLS) als auch ein 'nuclear export signal' (NES) aufweist. C-terminal zur HLH Region liegt die PAS Domäne. Sie ist 250 bis 300 Aminosäuren lang und setzt sich aus 2 Untereinheiten, A und B, zusammen, die aus etwa je 50 Aminosäuren mit größtenteils unpolaren Resten bestehen. Die PAS Domäne findet sich auch in einer Vielzahl von anderen Proteinen, die unter anderem in zellulären Prozessen der Hypoxieantwort, des Biorhythmus, des Fremdstoffmetabolismus, der hormonellen Regulation, der Neurogenese und der Transkriptionskoaktivierung involviert sind. Durch ihre Struktur und Position beeinflusst sie Protein/Protein Interaktionen, wie die Bindung an das Chaperon 'heat shock protein' (hsp) 90, die DNA-Erkennung und die Ligandbindung. Hsp90 interagiert sowohl mit der PAS B Region als auch mit der bHLH Domäne. Dadurch wird im Ligand-freien Status des AhR das NLS maskiert und die Ligand-bindende Konformation stabilisiert. Das NES ist für den nukleären Export des Rezeptors verantwortlich, der seine proteasomale Degradierung zur Folge hat.

Der wenig konservierte C-terminale Bereich des AhR beinhaltet eine komplexe, Glutaminreiche ('Q-rich subdomain') Domäne, die eine Vielzahl von stimulatorischen und inhibitorischen Untereinheiten enthält. Die funktionellen Unterschiede in der Transaktivierung des ARNT und AhRR in Vergleich zum AhR werden durch diesen variablen Sequenzbereich bestimmt. Die Dimerisierung des AhR mit ARNT ist entscheidend für seine spezifische Interaktion mit responsiven DNA-Elementen. (Bradfield et al., 1991; Crews, 1998; Denison et al., 2002; Hahn, 2002; Lees und Whitelaw, 1999; Lindebros et al., 1995; Mimura und Fujii-Kuriyama, 2003; Nie et al., 2001; Phelan et al., 1998; Pongratz et al., 1998; Pratt, 1997; Swanson und Bradfield, 1993; Whitlock, 1999)

1.1.3 AhR-Signaltransduktion

Der AhR liegt in seinem inaktiven Zustand als zytosolischer Multiproteinkomplex vor. Dieser besteht aus dem AhR, einem hsp90 Dimer, dem Ko-Chaperon p23 und dem Immunophilin-homologen Protein 'Hepatitis Virus X-assoziierte Protein 2' (XAP), auch 'AhR associated protein' (ARA9) oder 'AhR interacting protein' (AIP) genannt. (Carver und Bradfield, 1997; Denison et al., 2002; Kazlauskas et al., 1999; Petrusis et al., 2003; Petrusis und Perdew, 2002; Schmidt und Bradfield, 1996) XAP2 bindet sowohl an den AhR als auch an hsp90 und trägt damit wahrscheinlich zur Stabilisierung des zytosolischen, Ligand-freien AhR-Komplexes

bei. Allerdings zeigen neuere Untersuchungen, dass dieses Protein nicht essentiell für die Funktionalität des AhR ist. (Bell und Poland, 2000; LaPres et al., 2000; Lees et al., 2003; Meyer et al., 1998 und 2000; Petrusis und Perdew, 2002) p23 scheint eine Rolle in der Stabilisierung der ATP-gebundenen Form und der Ligand-vermittelten Abspaltung von hsp90 zu spielen (Kazlauskas et al., 1999; Freeman et al., 2000).

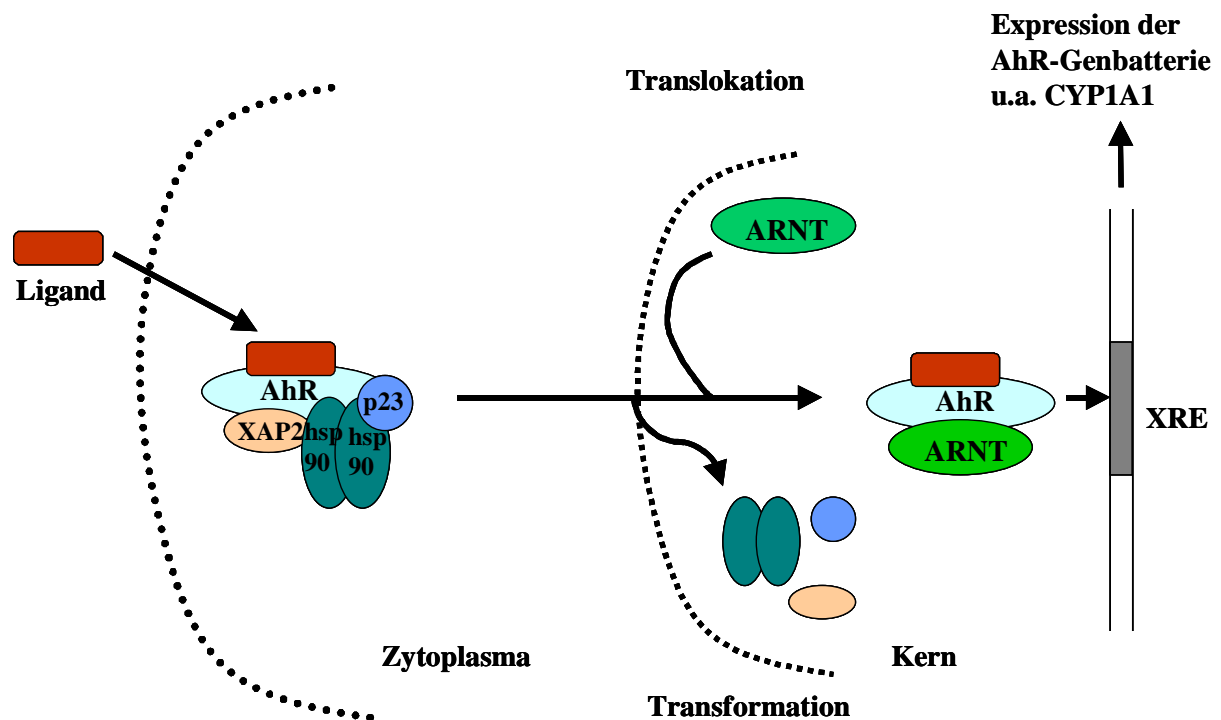


Abbildung 1.2: Modell des AhR-Signaltransduktionsweges

Nach Eintritt eines Liganden in die Zelle, was z.B. durch einfache Diffusion erfolgt, bindet dieser an den AhR und führt zu einer Temperatur-abhängigen Transformation, was eine verstärkte Ligandbindung und Freilegung des NLS zu Folge hat. Der Ligand-Rezeptor-Komplex transloziert unter Energieverbrauch in den Nukleus, wobei noch nicht geklärt ist, ob die mit dem Rezeptor assoziierten Proteine hierbei bereits im Zytosol oder erst im Kern abgelöst werden. Nun erfolgt die Bindung von ARNT, welches im Zellkern lokalisiert ist und entgegen seiner Benennung keine Bedeutung für die Ligand-aktivierte Translokation des AhR hat (Carver et al., 1994; Denison et al., 2002; Pollenz et al., 1994; Reyes et al., 1992; Scheel et al., 2002; Scheel und Schrenk, 2000). Neuere Untersuchungen zeigen, dass die Abspaltung von hsp90 notwendig für die Bildung des AhR/ARNT Heterodimers ist (Heid et al., 2000).

Der entstandene AhR/ARNT/Ligand-Komplex ist ein Transkriptionsfaktor, der mit hoher Affinität an spezifische Enhancer-Sequenzen der DNA bindet. Diese sogenannten 'xenobiotic responsive elements' (XRE), auch 'dioxin responsive elements' (DRE) oder 'aryl hydrocarbon responsive elements' (AHRE) genannt, enthalten die für die Bindung essentielle Nukleotidfolge 5'-CGTG-3'. Diese Bindung führt zu einer Änderung der lokalen Chromatinstruktur und der Möglichkeit für Transkriptionsfaktoren mit dem Promotor zu interagieren, was die Regulation einer Vielzahl von Genen beeinflusst. Aufgrund der zahlreichen Kofaktoren der Signaltransduktion, wobei insbesondere das ARNT Protein in eine Vielzahl von anderen Signaltransduktionswegen involviert ist, und der Fähigkeit des AhR, mit einer Vielzahl von Proteinen zu interagieren, kann dieser auch indirekt die Expression von Genen modifizieren. So fördert die Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) die AhR/ARNT-vermittelte Geninduktion. Daher wird vermutet, dass der aktivierte Komplex z.B. an den Tyrosinresten des AhR phosphoryliert wird. (Antonsson et al., 1995; Chaffin et al., 2000; Chen und Tukey, 1996; Long und Perdew, 1999; Nebert et al., 2000; Nie et al., 2001; Puga et al., 2002; Tscheudschilsuren et al., 1999; Whitlock, 1999; Wilson und Safe, 1998)

Die DNA-Bindung des aktiven Komplexes beeinflusst die Regulation hiervon abhängiger Gene. Anschließend wird der Rezeptorkomplex unter Aktivierung des NES in das Zytosol transloziert und dort Ubiquitin-abhängig im Proteasom abgebaut. Die Blockierung der AhR Degradation kann zu einer kontinuierlichen Aktivierung der AhR-vermittelten Genexpression führen. Damit verbunden sind nachteilige Effekte für die Zelle, wie z.B. Abbau der freien ARNT-Konzentration. (Kolluri et al., 1999; Ma und Baldwin, 2000; Pollenz, 1996 und 2002; Song und Pollenz, 2002; Wormke et al., 2000)

Der konstitutiv aktive AhRR konkurriert mit dem AhR um die Heterodimerisierung mit ARNT. Der resultierende Komplex bindet an XREs, ist jedoch nicht in der Lage, die Genexpression zu aktivieren. Daher kann über einen Feedback-Mechanismus mit dem AhRR die Signaltransduktion des AhR reguliert werden. (Baba et al., 2001; Karcher et al., 2002; Mimura et al., 1999; Watanabe et al., 2001)

1.1.4 AhR- Genbatterie

Der AhR reguliert über die XRE-Bindung seines aktiven AhR/ARNT/Ligand-Komplexes eine Vielzahl von Genen, die zusammenfassend als AhR-Genbatterie bezeichnet werden. Hierzu

gehören die fremdstoffmetabolisierenden Phase I Enzyme der Cytochrom P450 (CYP)- Familie CYP1A1 und 1A2, CYP1B1 und CYP2A8 (Hamster). Auch konnte ein neues CYP Enzym, CYP2S1, identifiziert werden, das durch z.B. TCDD AhR-vermittelt induzierbar ist. CYP2S1 wird in vielen Geweben konstitutiv exprimiert, insbesondere in der Lunge. Seine Aktivierung durch AhR-Liganden, z.B. im Tabakrauch, könnte eine wichtige Rolle in der Karzinogenese dieser Verbindungen spielen. (Rivera et al., 2002; Safe und Krishnan, 1995; Song et al., 2002)

Weitere Enzyme, die über den AhR-Signaltransduktionsweg kontrolliert werden, sind Glutathion-S-transferase γ , NAD(P)H:Chinonoxidoreduktase, Aldehyd-3-dehydrogenase (ALDH3) und UDP-Glucuronosyltransferasen 1A6 (UGT1A6) und 1A9. (Bock, 1994; Rowlands und Gustafsson, 1997; Sogawa und Fujii-Kuriyama, 1997; Whitlock, 1987)

AhR-Liganden beeinflussen die Expression weiterer Gene. So werden unter anderem wichtige Faktoren für Zellwachstum und -differenzierung wie 'transforming growth factor' TGF- α und TGF- β 2, 'plasminogen activator inhibitor 2' (PAI-2), Interleukin-1 β (IL-1 β), c-jun und c-fos von TCDD induziert. (Abott et al., 1998; Bock, 1994; Hankinson, 1995; Rowlands und Gustafsson, 1997)

Des Weiteren greifen AhR-Liganden direkt oder indirekt in die Regulation endokriner Systeme ein. Der AhR ist in der Lage als Inhibitor für Estrogen-induzierte Gene zu fungieren, wie z.B. Cathepsin D, 'tissue plasminogen activator' und 'uterine epidermal growth factor', die unter anderem bei der Modulation des Progesteron- und Estrogen-Rezeptors eine Rolle spielen. Der antiestrogene Effekt vieler AhR-Agonisten ist für die Karzinogenese hormonabhängiger Tumore und deren Therapie von Bedeutung (Rowlands und Gustafsson, 1997; Safe, 1995 und 2001; Safe et al., 1998; Sogawa und Fujii-Kuriyama, 1997)

1.2 CYP1A1

Die Induktion der *CYP1A1* Genexpression gilt als der Biomarker für die biologische Aktivität von AhR-Liganden. Sie ist daher ein wichtiger Faktor zur Untersuchung des Mechanismus der Transkription und Regulation von Ligand-vermittelten Effekten auf den Organismus.

1.2.1 Cytochrom P450

Cytochrom P450 (CYP) Enzyme sind Häm-haltige Monooxygenasen, die in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums vorliegen. Einige Mitglieder dieser Familie sind aber auch z.B. in den Mitochondrien im Gehirns zu finden. CYPs spielen eine wichtige Rolle in der oxidativen Biotransformation von Fremdstoffen, was sowohl zu einer Aktivierung der Substrate und eventuell zur Bildung karzinogener Metabolite als auch zur Detoxifizierung führen kann. Weiterhin sind CYPs involviert in die Synthese und den Metabolismus von Steroiden, Retinoiden, Fettsäuren, Prostaglandinen, Leukotrienen, Gallensäuren und anderen endogenen Verbindungen.

Sie katalysieren unter anderem Hydroxlierungen, Epoxidierungen, Dealkylierungen und Dehalogenierungen über die Einführung eines aktivierten Sauerstoff-Atoms in das Substrat.

Die CYP Enzyme sind in unterschiedlichen Konzentrationen in nahezu allen Geweben zu finden, wobei die Leber den höchsten Gehalt aufweist. (Anzenbacher und Anzenbacherová, 2001; Danielson, 2002; Safe, 1995)

1.2.2 CYP1A Familie

Die humane CYP1A Familie beinhaltet 2 Isoformen, CYP1A1 und 1A2. CYP1A2 wird konstitutiv in stark unterschiedlichen Gehalten vor allem in der Leber exprimiert. CYP1A1 findet sich zumeist in extrahepatischen Geweben, wie z.B. Lunge, Plazenta, Haut und Lymphozyten, und nur in geringer Konzentration in der Leber. Seine maßgebliche Rolle im hepatischen Metabolismus von PAHs und anderen Umweltkontaminanten geht auf seine hohe, AhR-vermittelte Induzierbarkeit zurück. Neben der Funktion als fremdstoffmetabolisierendes Enzym spielt CYP1A1 auch eine Rolle in der zellulären Antwort auf oxidativen Stress, der Embryogenese (Maus) und der Regulation des Ligandstatus, welcher in Zellwachstum, neuroendokrinen Funktionen, Differenzierung und Homeostase involviert ist. (Batt et al., 1994; Dey und Nebert, 1998; Gonzalez und Kimura, 2003; Hankinson, 1995; Hukkanen et al., 2000; Nebert, 1994; Nebert et al., 1993 und 2000; Safe, 1995; Schrenk et al., 1995; Whitlock et al., 1996)

1.2.3 Regulation des CYP1A1

1.2.3.1 Ligand-induzierte Regulation

Die CYP1A1 Expression wird nicht nur durch die aktivierende transkriptionelle Kontrolle des AhR induziert, sondern auch durch andere Transkriptionsfaktoren Zell- und Spezies-spezifisch negativ reguliert. Negative regulatorische Elemente (NREs) konnten im CYP1A1 Promotor von Mensch und Ratte nachgewiesen werden (Hines et al., 1988). Diese binden auf noch ungeklärte Weise nukleäre Faktoren und reprimieren damit die Gentranskription (Boucher et al., 1993 und 1995). Untersuchungen mit Cycloheximid in verschiedenen Zelllinien führten zu einer Superinduktion von CYP1A1, vermutlich über ein labiles Protein, das die CYP1A1 Transkription inhibiert (Luska et al., 1992) und damit sowohl die konstitutive als auch die induzierbare Genexpression reguliert. Des Weiteren könnten noch unbekannte Faktoren die Interaktion des aktiven AhR-Komplex mit dem CYP1A1 Enhancer stören (Takahashi et al., 1996 und 1997).

Studien in verschiedenen Maushepatom-Zelllinien mit variabler CYP1A1-Induktion führten zu der Hypothese, dass die Genexpression von CYP1A1 einer autoregulatorischen Feedbackschleife unterliegt (Hankinson, 1983; Hankinson et al., 1985; Kimura et al., 1987). Es gibt zwei Hypothesen über den Mechanismus der Autoregulation. Zum einen könnte ein endogenes Substrat eine Rolle spielen, welches die Transkription des CYP1A1 stimuliert und dadurch selbst inaktiviert wird, wobei es in Abwesenheit eines funktionellen Enzyms in der Zelle akkumuliert und zur mRNA-Bildung führt. Alternativ könnte das endogene Substrat durch CYP1A1 metabolisch aktiviert werden, wobei ein Ko-Repressor entsteht, der über Assoziation an einen Proteinapo-Repressor zu einer Repression der Transkription führt.

Die zweite Hypothese geht von einem inaktiven Repressorprotein aus, das durch Interaktion mit CYP1A1 funktionalisiert wird und die Gentranskription hemmt. (Chang und Puga, 1998; Hankinson et al., 1985; RayChaudhuri et al., 1990; Robertson et al., 1987; Zhou und Gasiewicz, 2003)

1.2.3.2 Ligand-unabhängige Aktivierung des CYP1A1

Im letzten Jahrzehnt wurden CYP1A1 Induktoren, wie z.B. Benzimidazole, Carotinoide, Retinoide, Carbaryl und Primaquin, entdeckt, die sich strukturell von den klassischen Liganden unterscheiden. Sie können die CYP1A1 Genexpression steigern, aber nicht mit TCDD um die

AhR-Bindung konkurrieren (Backlund et al., 1999; Fontaine et al., 1999; Ledirac et al., 1997). Dies könnte daran liegen, dass diese Substanzen nur schwache Liganden des AhR darstellen und eine AhR-Bindung experimentell bisher nur schwer zu detektieren ist. Allerdings konnte jetzt unter anderem für Carbaryl und Primaquin eine Bindungsaffinität zum AhR nachgewiesen werden (Backlund und Ingelman-Sundberg, 2004; Denison et al., 1998, Werlinder et al., 2001). Eine weitere Hypothese hierfür ist die Bildung eines AhR-bindenden Metaboliten aus den Ausgangsverbindungen (Bradshaw et al., 2002). Alternativ könnte die Induktion von CYP1A1 auch durch Interaktionen mit anderen Signaltransduktionswegen erfolgen. So scheinen Retinoide und Carotinoide CYP1A1 über ein 'retinoid acid responsive element' zu aktivieren. Des Weiteren sind wahrscheinlich auch PKC und Tyrosinkinasen in die Aktivierung dieses Enzyms z.B. durch Omeprazol, Primaquin und Carbaryl involviert. (Backlund et al., 1997; Delescluse et al., 2000; Vecchini et al., 1994)

Eine weitere Möglichkeit der CYP1A1 Induktion besteht im indirekten Einfluss des AhR-Signaltransduktionsweges ohne Ligand auf verschiedene Rezeptoren, wie z.B. Glukokortikoidrezeptor (GR), Estrogenrezeptor und Retinoidrezeptor (RR) über Feedback-Regulation oder Gewebe-spezifische Interaktionen.

Somit ist auch die Induktion des CYP1A1 durch Substanzen, die nicht als AhR-Liganden fungieren, indirekt vom AhR und dessen Interaktionen mit anderen nukleären Faktoren abhängig. (Angus et al., 1999; Bradshaw et al., 2002 ; Brake et al., 1998; Whitlock, 1999)

1.3 Liganden des AhR und CYP1A1

Eine Vielzahl von Studien in den letzten Jahrzehnten zeigte, dass der AhR - untypisch für Ligand-regulierte Rezeptoren - in der Lage ist, strukturell sehr unterschiedliche Substanzen zu binden. Hierbei wird unterschieden zwischen einer 'high affinity' Bindung an den AhR wie etwa bei TCDD und 'low affinity' Liganden, zu denen einige Pharmazeutika und endogene Liganden gehören. Struktur-Aktivitäts-Untersuchungen mit PAKs und halogenierten aromatischen Kohlenwasserstoffen (HAKs) ergaben, dass Liganden mit hoher Bindungsaffinität zu meist aromatische, planare und relativ hydrophobe Verbindungen sind. Das Bindungsvermögen ist allgemein stark abhängig von den thermodynamischen Eigenschaften und der Elektronenverteilung im Molekül. Schwache Liganden entsprechen nur unzureichend diesen Krite-

rien. Die Tatsache, dass viele dieser Substanzen in Ligand-Bindungs-Assays nicht mit radioaktiv markiertem TCDD um die Bindung am AhR konkurrieren, führte zu der Hypothese, dass unterschiedliche Bereiche der AhR-Ligandbindungsdomäne für die Interaktionen der beiden Ligandbindungstypen mit dem Rezeptor verantwortlich sind. (Backlund und Ingelman-Sundberg, 2004; Bradshaw et al., 2002; Denison et al., 2002; Denison und Nagy, 2003; Hankinson, 1995; Nebert, 1994; Whitlock, 1999)

Die Einteilung der Liganden erfolgt jedoch nicht nach ihrer Bindungsaffinität, sondern nach ihrer Herkunft. Es gibt zwei große Kategorien, die exogenen Liganden, die meist als Folge anthropogener Aktivitäten entstehen und in der Umwelt weit verbreitet sind, und die natürlichen Liganden. Diese entstehen durch biologische Prozesse und werden nochmals unterteilt in exogene Stoffe, die größtenteils über die Nahrung in den Organismus gelangen, und endogene Verbindungen, die im Körper gebildet werden.

1.3.1 `Klassische' exogene Liganden

In dieser Gruppe finden sich die `klassischen' Liganden. Hierzu gehören PAKs (z.B. 3-Methylcholanthren, Benzoanthracene, Benzoflavone, Benzo[a]pyren) und HAKs wie polychlorierte Biphenyle (PCBs), polychlorierte Dibenzo-p-dioxine (PCDDs), polychlorierte Dibenzofurane (PCDFs).

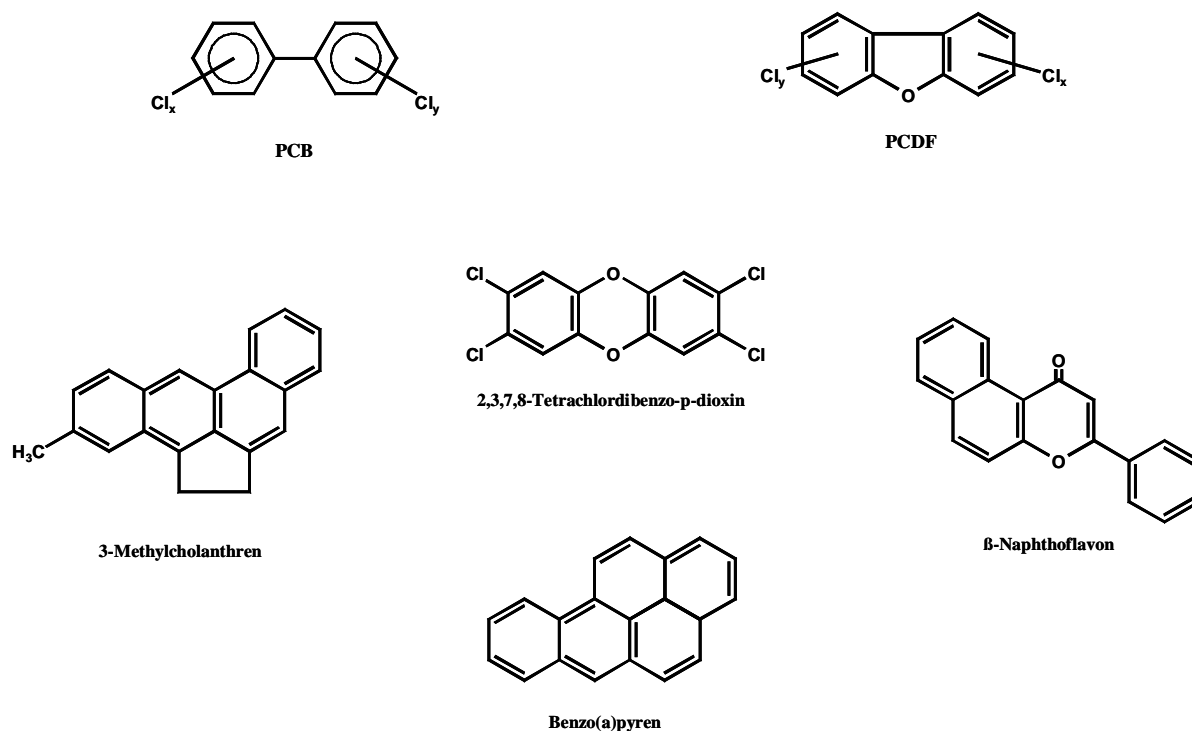


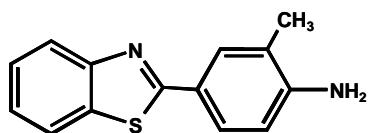
Abbildung 1.3: Strukturen von 'klassischen' AhR-Liganden

Die Mitglieder dieser Verbindungsklassen weisen zumeist eine hohe Bindungsaffinität an den AhR auf und entsprechen den hierfür postulierten Strukturkriterien.

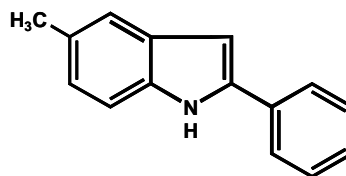
Als Leitsubstanz dient TCDD, einer der potentesten Induktoren des AhR. TCDD ist persistent in der Umwelt und entsteht bei Verbrennungsprozessen sowie bei der Synthese von Organochlorverbindungen als Verunreinigung. Es reichert sich in der Nahrungskette an und akkumuliert zum größten Teil im Fettgewebe mit einer Halbwertszeit von 10 Jahren beim Menschen (Pirkle et al., 1989). Seine biologischen und toxischen Effekte sind sehr gut untersucht und beinhalten die Induktion fremdstoffmetabolisierender Enzyme, Tumorpromotion, Immunsuppression, Thymusatrophie, Porphyrie, Lebertoxizität, Chlorakne, Wasting-Syndrom und Teratogenität. (Bock, 1994; Denison und Heath-Pagliuso, 1998; Dragan und Schrenk, 2000; Huff et al., 1994; Okey et al., 1994; Safe, 1995; Schmitz et al., 1995; Schrenk et al., 1995 und 2004; Schrenk, 1998; Tan et al., 2002; Till et al., 1999; van den Berg et al., 2000; van Leeuwen et al., 2000; Xu et al., 2000; Zeiger et al., 2001)

Zu den 'nicht-klassischen' Liganden gehören sehr unterschiedliche Substanzklassen unter anderem Benzimidazole wie Thiabendazol und der Magensäureblocker Omeprazol. Carbaryl, ein Insektizid, das als schwacher Cholinesterase-Hemmer fungiert, Diflubenzuron, ein Chitin-

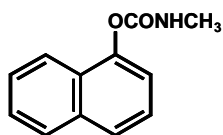
syntheseinhibitor, und bestimmte Pharmazeutika wie YH439 zählen ebenfalls zu dieser Gruppe. (Backlund et al., 1999; Denison und Heath-Pagliuso, 1998; Ledirac et al., 1997 und 2000; Lee et al., 1996).



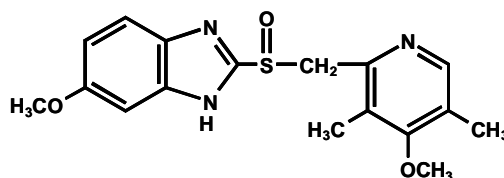
2-(4-Amino-3-methylphenyl)-benzothiazol



5-Methyl-2-phenylindol



Carbaryl



Omeprazol

Abbildung 1.4: Nicht 'klassische' Liganden des AhR

1.3.2 Natürliche Liganden

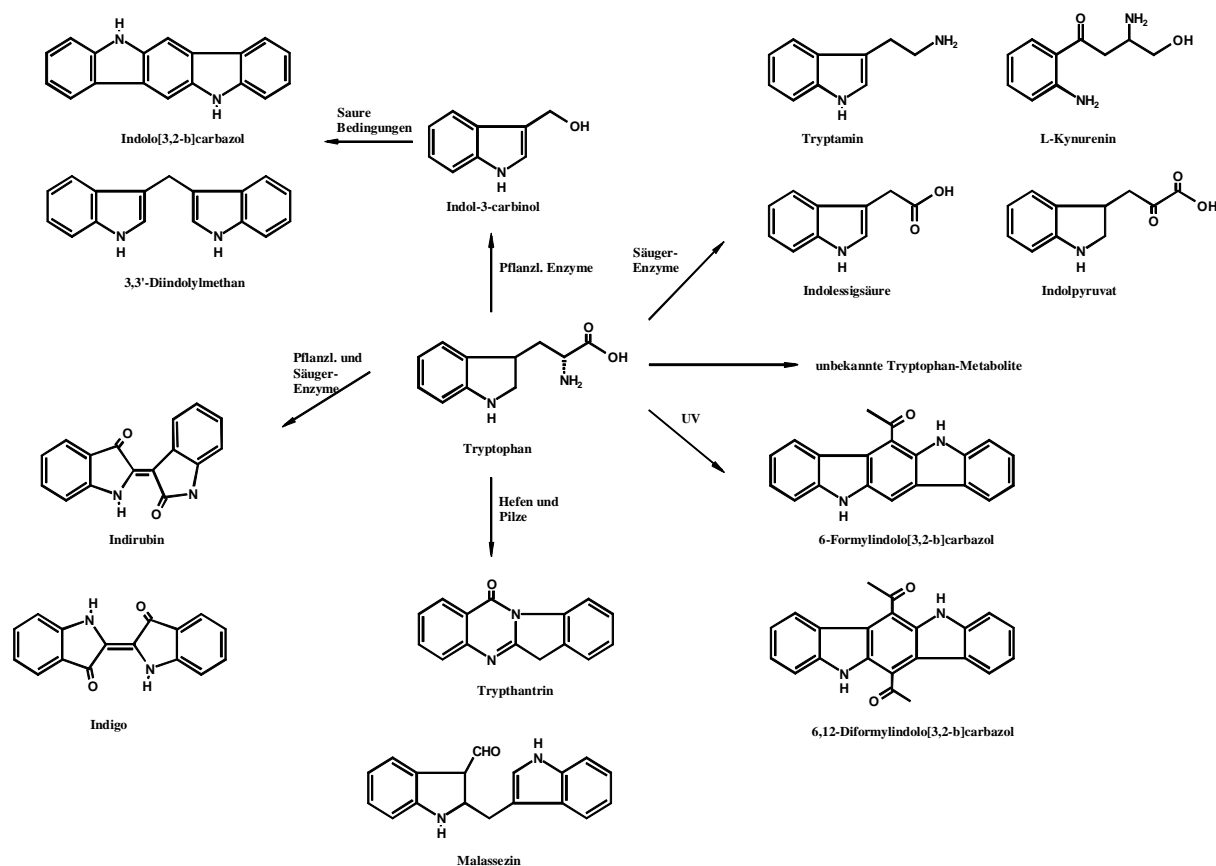


Abbildung 1.5: Natürliche exogene und endogene AhR-Liganden, gebildet aus Tryptophan

1.3.2.1 Exogene Liganden

Die größte Expositionsquelle von Organismen für natürliche AhR-Liganden ist die Nahrung. Die hier vorkommenden Liganden haben eine meist schwache Bindungsaffinität zum AhR. Hierzu gehören unter anderem Indol-3-carbinol (I3C), Carotinoide wie Canthaxanthin, Rutacarpine wie 7,8-Dihydrorutacarpin, Dibenzoylmethane und Flavonoide. Diese Substanzklassen kommen hauptsächlich in pflanzlicher Nahrung oder Pflanzenextrakten vor, z.B. Gemüse, Früchten, Kräutern oder Tee (Takahashi et al., 1995).

Kruziferen (Kreuzblütler) wie Spargel, Kohl, Brokkoli und Blumenkohl enthalten eine große Menge an Indolylglukosinolen, z.B. Glukobrassicin. Ihre Degradation führt z.B. zur Bildung von I3C, einer bekannten Vorstufe von AhR-Liganden. Die Umsetzung von Indolen und Tryptophan im Gastrointestinaltrakt, wie beispielsweise die Säure-katalysierte Reaktion von

I3C, führt zur Bildung von wesentlich potenteren AhR-Liganden, wie 3,3'-Diindolylmethan (DIM) und des hochaktiven Indol[3,2-b]-carbazol (ICZ). ICZ hat eine AhR-Bindungsaffinität in Bereich von etwa 0,2-3,6 nM und einen EC₅₀ von 296 nM für die Induktion von CYP1A1 in der Maushepatomzelllinie Hepa1c1c7 (Bjeldanes et al., 1991; Gillner et al., 1993; Kleman, 1994; Park et al., 1996). Trotz dieser starken Induktion des AhR-Signaltransduktionsweges zeigen Untersuchungen in TCDD-sensitiven Long-Evans-Ratten keinerlei mit TCDD vergleichbaren toxischen Effekte nach Gabe von ICZ (Pohjanvirta et al., 2002). Eine AhR-vermittelte estrogene bzw. antiestrogene Wirkung von ICZ konnte *in vitro* in der humanen Brustkrebszelllinie MCF-7 nachgewiesen werden (Liu et al., 1994). Weitere Indol-haltige Komponenten wie N-Methoxy-I3C und zyklische Trimere aus I3C zeigen ebenfalls AhR-vermittelte Effekte, insbesondere im Hinblick auf den Metabolismus von Xenobiotika und deren Toxizität. (Ashida et al., 1998; Kleman, 1994; Kravchenko et al., 2001; Riby et al., 2000; Shiotani et al., 2001; Stephensen et al., 2000)

Bakterien des Gastrointestinaltraktes sind in der Lage, aus Tryptophan und Indolen AhR-Liganden zu bilden, was die Bedeutung dieser Verbindungsgruppe für die 'natürlich' hervorgerufene Aktivierung des AhR-Signaltransduktionsweges noch hervorhebt. (Bonnesen et al., 2001; Chang et al., 1999; Chen et al., 1998; Jellinck et al., 1993; Kravchenko et al., 2001; Perdew und Babbs, 1991; Renwick et al., 1999; Riby et al., 2000; Staack et al., 1998; Stephensen et al., 2000)

Tryptanthrine sind ebenfalls AhR-Agonisten. Sie entstehen durch Biosynthese aus Tryptophan und Anthranilsäure in *Candida lipolytica*, einem in Lebensmitteln vorkommenden Hefepilz (Schrenk et al., 1997 und 1999).

Flavonoide repräsentieren die größte Gruppe an in Lebensmitteln vorkommenden AhR-Liganden. Hierzu gehören unter anderem Flavanole, Flavone, Flavanone und Isoflavone. Sie sind in einer Vielzahl von pflanzlichen Nahrungsmitteln, Extrakten und Pharmazeutika zu finden. Flavonoide fungieren als Agonisten und/oder Antagonisten des AhR und der AhR-vermittelten Genexpression insbesondere der CYP-Induktion. Einige Verbindungen haben sowohl agonistisches als auch antagonistisches Potential. Dazu gehören Quercetin, Galangin und Tangeretin, wobei Enzymeffekte und eine eventuelle antikanzerogene Wirkung sehr stark von der Konzentration der Substanzen sowie der experimentellen Methodik abhängig sind. (Ashida, 2000; Canivenc-Lavier et al., 1996; Ciolino et al., 1998 und 1999; Henry et al.,

1999; Hodek et al., 2002; Jeuken et al., 2003; Kühnau, 1976; Lautraite et al., 2002; Li et al., 2002; Shertzer et al., 1999; Siess et al., 1989; Zhai et al., 1998; Zhang et al., 2003)

Verschiedene Studien zeigten, dass Resveratrol, ein Inhaltsstoff von Trauben und auch Wein, ebenso wie viele Flavonoide inhibitorisch auf die AhR-induzierte Genexpression von CYP1A1 wirkt und in der Lage ist, pathologische Effekte eines aktivierten AhR auf die Zelle zu verhindern. (Casper et al., 1999; Ciolino und Yeh, 1999)

1.3.2.2 Endogene Liganden

Studien zeigten, dass auch in der Abwesenheit von exogenen Liganden der AhR-Signaltransduktionsweg aktiviert ist. Dies spricht für die Existenz von endogenen Liganden des AhR. Ein Hinweis hierfür ist, dass der aktivierte AhR-Komplex im Kern in Gewebeschnitten von unbehandelten Tieren und in unbehandelten Zellkulturen zu finden ist (Abbott et al., 1994; Andersson et al., 2002; Chang und Puga, 1998). Des Weiteren spielt der AhR in Abwesenheit eines exogenen Liganden eine Rolle in der Regulation des Zellzyklus (Ma und Whitlock, 1996). Die CYP1A1 Induktion erfolgt ohne exogene Ligandaktivierung z.B. bei Veränderung der Zellwachstumsbedingungen, hydrodynamischer Scherung und zellulärem Stress wie Hypoxie. Dies deutet auf die Bildung endogener AhR-Agonisten bei diesen Prozessen hin (Crawford et al., 1997; Mufti und Shuler, 1995 und 1996; Okamoto et al., 1993; Sadek und Allen-Hoffman, 1994).

Auch die Beobachtung, dass eine Blockierung der AhR-Expression in Mausembryonen zu Entwicklungsstörungen führt, spricht für diese Hypothese (Peters und Wiley, 1995). Studien an AhR-Knockout Mäusen zeigten, dass der AhR eine Rolle in vielen physiologischen Prozessen, sowie bei der Entwicklung der Leber und des Immunsystems spielt (Schmidt et al., 1996; Lin et al., 2001).

Einige relativ schwache endogene Liganden konnten bereits identifiziert werden, aber ihre genaue physiologische Bedeutung in der Regulation der AhR-Funktion *in vivo* bedarf noch weiterer intensiver Forschung. Im Nachfolgenden werden einige endogene Liganden, eingeteilt nach ihrer Verbindungskategorie, näher erläutert.

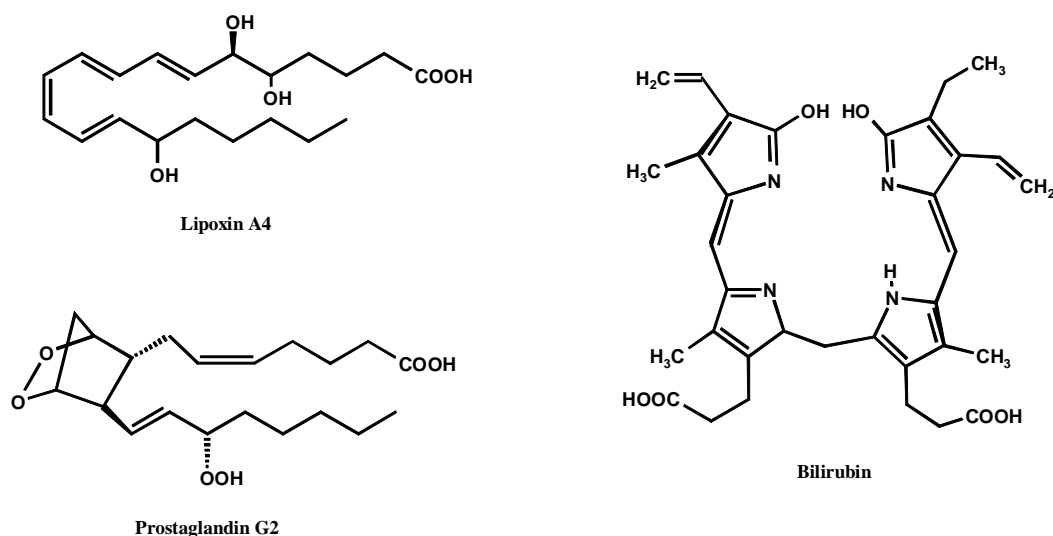


Abbildung 1.6: Weitere natürliche und endogene Liganden des AhR

1.3.2.2.1 Indole

Indol-haltige Liganden werden zum größten Teil aus Tryptophan gebildet. UV-induzierte Tryptophan-Photoprodukte sind in der Lage, in Haut und Leber von Nagern CYP1A1 zu induzieren (Goerz et al., 1983 und 1996). Sie sind vollständige Agonisten des AhR in Hefen und Säugerzellen. Zwei dieser aktiven Photoprodukte konnten identifiziert werden. Die potenteste Verbindung ist 6-Formyl-indol[3,2-b]-carbazol (FICZ), eng verwandt mit dem aus I3C exogen gebildeten ICZ. FICZ verursacht eine schnelle und transiente Induktion des AhR-Signalwegs *in vitro*. In Zellkultursystemen wurde gezeigt, dass die Metabolisierung und der Abbau des FICZ über CYP1A1 verläuft. Andere Photoderivate von Tryptophan sind Indol-3-acetaldehyd und Indolessigsäure, letztere ist ebenfalls ein schwacher AhR-Ligand. Die Bildung von Serotonin und Melatonin geht ebenfalls von Tryptophan aus, und könnte zu AhR-Liganden führen. Auch UV-Histidin-Photoprodukte sind AhR-aktiv. Die Tatsache, dass alle diese Verbindungen von Lichteinwirkung abhängig sind, könnte für ihre Bedeutung als Lichtsensoren in physiologischen Prozessen sprechen. (Bergander et al., 2003; Paine und Francis, 1980; Rannug et al., 1987, 1992 und 1995; Sindhu et al., 2000; Wei et al., 1999 und 2000)

Tryptamine und auch Kynurenine sind ebenfalls zur AhR-Aktivierung befähigt. Da diese Verbindungen schwache Liganden des AhR darstellen, reichen die physiologischen Konzentrationen unter normalen Bedingungen nicht zu einer Aktivierung des AhR aus. Akkumulieren

sie jedoch aufgrund von Veränderungen in der Zelle, z.B. Enzyminhibition, so kann eine Induktion des AhR stattfinden. (Heath-Pagliuso et al., 1998)

Die Indigoide Indirubin und Indigo sind äußerst potente Induktoren des AhR in auf Hefen basierenden Bioassays. In Zellkultursystemen zeigen diese im menschlichen Urin vorkommenden Verbindungen eine geringere Affinität zum AhR, was auf die experimentellen Unterschiede der Studien zurückzuführen ist. Die Induktion des AhR durch Indigo, Indirubin und Indirubin-3'-oxim ist transient und abhängig von der CYP1A1 Induktion, was auf eine selbst-aktivierte Metabolisierung der Substanzen zurückzuführen ist. Ob diese Indigoide wirklich zu den endogen gebildeten Liganden gehören, muss noch geklärt werden. (Adachi et al., 2001; Denison et al., 2002; Eisenbrand et al., 2004; Güngerich et al., 2004; Hoessel et al., 1999; Marko et al., 2001; Miller, 1997 und 1999; Spink et al., 2003)

1.3.2.2.2 Tetrapyrole

Das Häm-Degradationsprodukt Bilirubin ist ein schwacher physiologischer Ligand des AhR, wie in Reporter-genuntersuchungen und anhand der CYP1A1 Induktion gezeigt werden konnte. Biliveridin, der Vorläufer des Bilirubin, verursacht ebenfalls eine XRE-abhängige Aktivierung des Reporter-genkonstrukts, jedoch ist nicht auszuschließen, dass dies auf die Bildung von Bilirubin zurückzuführen ist. Da Bilirubin ein Substrat für CYP1A1 darstellt, könnte die Aktivierung des AhR eine autoregulatorische Funktion auf den Bilirubingehalt im Blut haben. (Kapitulnik und Gonzalez, 1993; Phelan et al., 1998; Sinal und Bend, 1997)

1.3.2.2.3 Arachidonsäuremetabolite

AhR-Liganden wie TCDD können die Membranlipidoxidation und Phospholipase A stimulieren und damit die Freisetzung von Arachidonsäure fördern. Dies führt durch die Induktion von z.B. CYP1A1 und Prostaglandinsynthase H2 zur Bildung von Prostaglandinen. Prostaglandine andererseits sind relativ schwache AhR-Liganden im Zellkultursystem. Akkumulation und synergistische Effekte der einzelnen Prostaglandine könnten jedoch zu einer hohen Induktion des AhR *in vivo* führen, wie es *in vitro* in Reporter-genuntersuchungen gezeigt werden konnte. (al-Bayati und Stohs, 1991; Denison und Nagy, 2003; Seidel et al., 2001; Tithof et al., 1996)

Aufgrund der Wechselwirkungen des AhR mit dem Arachidonsäuremetabolismus sind biologische Lipide und Steroide möglicherweise Liganden des AhR. Ein Vertreter dieser Verbin-

dungen ist Lipoxin A4, ein Lipxygenaseprodukt von Arachidonsäure, das in der Lage ist, CYP1A1 zu induzieren und an ein XRE-gesteuertes Reportergen zu binden. (Denison et al., 2002; Schaldach et al., 1999)

1.3.2.2.4 Weitere Liganden

7-Ketocholesterol ist ein AhR-Antagonist und spielt eine Rolle bei kardiovaskulären Erkrankungen (Savouret et al., 2003). Einige Karotinoide, wie z.B. Canthaxanthin, zeigten eine AhR-vermittelte CYP1A1 Induktion. Ihre Umwandlung *in vivo* zu Retinoiden lässt einen Rückschluss auf die komplexen Interaktionen des AhR mit dem Retinoid-Signalweg zu. (Denison und Nagy, 2003; Gradelet et al., 1997; Inouye et al., 1999; McSorley und Daly, 2000; Soprano und Soprano, 2003)

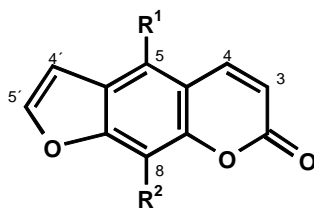
1.4 Furocumarine

Furocumarine sind sekundäre Pflanzenmetabolite, die als Phytoalexine fungieren und daher insbesondere bei Infektionen der Pflanze durch Mikroorganismen, Schädlingsbefall und andere Stressfaktoren gebildet werden. Sie kommen hauptsächlich in Umbelliferen (Doldenblütler), Rutaceen (Rautengewächsen), Moraceen (Maulbeergewächsen) und Leguminosen (Hülsenfrüchtler) vor. In pflanzlichen Lebensmitteln aus diesen Familien sind somit ebenfalls Furocumarine zu finden, z.B. in Limetten, Grapefruit, Zitronen, Sellerie, Pastinaken und Petersilie. Der Furocumarin-Gehalt variiert sehr stark, abhängig von Alter, Lagerung, Qualität (eventueller mikrobieller Befall etc.) und Prozessierung der Nahrungsmittel.

Furocumarine sind Cumarine mit einem ankondensierten Furanring, wobei dieser entweder linear (Psoralentyp) oder angular (Angelicintyp) positioniert ist.

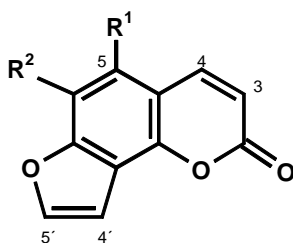
Tabelle 1.1: Struktur und Bezeichnung von Furocumarinen

Psoralentyp



| Bezeichnung | R ¹ | R ² |
|---------------------------------------|--|------------------|
| 8-MOP | H | OCH ₃ |
| 5-MOP | OCH ₃ | H |
| Isopimpinellin | OCH ₃ | OCH ₃ |
| Bergamottin | OCH ₂ CH=C(CH ₃)CH ₂ CH ₂ CH=C(CH ₃) ₂ | H |
| 6,7 - Dihydroxybergamottin | OCH ₂ CH=C(CH ₃)CH ₂ CH ₂ CH(OH)C(CH ₃) ₂ OH | H |
| Imperatorin | OCH ₂ CH=C(CH ₃) ₂ | H |

Angelicintyp



| Bezeichnung | R ¹ | R ² |
|-------------|------------------|------------------|
| Angelicin | H | H |
| Sphondin | H | OCH ₃ |
| Pimpinellin | OCH ₃ | OCH ₃ |

Aufmerksamkeit erlangten diese Verbindungen in der Vergangenheit aufgrund ihrer photochemischen bzw. phototoxischen Aktivität und ihres medizinischen Einsatzes in der Therapie von Hauterkrankungen wie Psoriasis und Vitiligo, der Psoralen-UVA (PUVA)-Therapie. Neuere Studien ergaben, dass Furocumarine in der Lage sind, die Funktion einer Vielzahl von Enzymen inklusive CYPs zu beeinflussen. Im Nachfolgenden werden einige mögliche biologische und toxische Effekte auf den Organismus erläutert. (Baumann et al., 1988; Kittler, 1976; Ostertag et al., 2002; Ramaswamy, 1975; Sardari et al., 1999; Schlatter, 1988; Wagstaff, 1991)

1.4.1 Photochemische Eigenschaften

Furocumarine sind abhängig von ihrer Substitution mehr oder weniger stark photoreaktive Substanzen. Nach UV-Bestrahlung gehen sie in einen lokalisierten Tripletzustand über, der die Grundvoraussetzung für photoadditive Reaktionen mit Makromolekülen wie ungesättigten Lipiden, Proteinen und der DNA darstellt. Die aktivierten Furocumarine reagieren an der 3,4 und/oder 4',5'-Doppelbindung mit der 5,6-Doppelbindung von Pyrimidinbasen der DNA (hauptsächlich Thymin und weniger stark mit Cytosin) zu C₄-Zykloadditionsprodukten. Dies führt zu Monoaddukten bzw. zu interstrand cross-links, abhängig von der Funktionalität des Furocumarins. Angulare Psoralene sind aufgrund ihrer sterischen Hinderung monofunktional, während lineare Psoralene, z.B. 8-MOP und 5-MOP, bifunktional sind und interstrand cross-links ausbilden können. Hydroxypsoralene sind photochemisch inaktiv, da sie in keinen stabilen Tripletzustand übergehen können. (Bates et al., 1995; Caffieri, 2002; Cleaver et al., 1985; Dall'Acqua et al., 1979; Gruenert et al., 1985; Isaacs et al., 1984; Mullen et al., 1984; Seki et al., 1978; Song et al., 1975)

Furocumarine können nach UV-Bestrahlung durch oxidative Prozesse reaktive Sauerstoffspezies generieren, welche dann mit Lipiden, Nukleinsäuren und Proteinen weiter reagieren und deren Funktion beeinträchtigen bzw. blockieren. Die Reaktion von Singulett-Sauerstoff mit dem Furocumarin selbst kann zu reaktiven langlebigen Intermediaten führen, die unter anderem die Lipidperoxidation auslösen. (Caffieri, 2002; Joshi und Pathak, 1983; Midden, 1988; Schmitt et al., 1995)

1.4.2 PUVA-Therapie

Die PUVA- oder Photochemotherapie ist eine effektive Behandlungsmöglichkeit bei Dermatosen wie Psoriasis, Vitiligo und bei Frühstadien von T-Zell-Lymphomen. Ihre Wirkung beruht auf antiproliferierenden Effekten auf die Hautzellen und der Beeinflussung der Immunantwort in erkrankten Hautbereichen. Die bereits beschriebenen Interaktionen mit Makromolekülen sind involviert in diese Prozesse und spielen unter anderem auch eine Rolle bei der Melanisierung der Haut. Die bei der PUVA-Therapie eingesetzten Furocumarine sind 8-MOP und 5-MOP. Die Applikation des Furocumarins erfolgt entweder lokal (Bade-PUVA) oder oral. Bei oraler Gabe spielt die Pharmakokinetik eine wichtige Rolle. Psoralene werden fast vollständig im Gastrointestinaltrakt resorbiert, meist über oxidative Prozesse metabolisch aktiviert (Epoxidierung, Hydroxylierung etc.), z.B. mit Glutathion konjugiert und rasch eliminiert. Die Halbwertszeit und das Therapiefenster für die UVA-Bestrahlung sind stark abhängig von der galenischen Formulierung der Psoralene. Hohe interindividuelle und Zeitabhängige Konzentrationsschwankungen von 8-MOP im Blut und Serum stellen einen kritischen Faktor für das Auftreten von Nebenwirkungen dar (siehe Toxizität). Ebenso spielt die Pigmentierung der Haut bei der Ausbildung negativer Nebeneffekte eine Rolle. (Bech-Thomson, 1992 und 1994; Billard et al., 1995; Brickl et al., 1984; Caffieri, 2002; Conconi et al., 1998; de Berker et al., 1997; de Wolff und Thomas, 1986; Garbe, 1992; Laskin, 1989; Schmid et al., 1980; Shepard et al., 2001; Stern, 2003; Sullivan et al., 1986; Zarebska et al., 2000)

Synthetisch hergestellte Derivate mit geringerem phototoxischen Potential und systemischer Aktivität sind aufgrund der Nebenwirkungen der Therapie von besonderem Interesse (Bordin et al., 2000; Marzano et al., 2000).

1.4.3 Toxizität, Mutagenität und Kanzerogenität

1.4.3.1 Ohne Lichteinfluss

Furocumarine zeigen eine stark Spezies-abhängige akute Toxizität in Tieren. So wurden für 8-MOP LD₅₀-Werte zwischen 200 und 4000 mg/kg KG ermittelt, während 5-MOP geringere LD₅₀-Werte aufweist. (Apostolou et al., 1979; Herold et al., 1981) Subchronische Toxizität von 8-MOP in Fischer 344 Ratten trat ab oral verabreichten Dosen von 200 mg/kg KG auf. Symptome waren unter anderem eine Verminderung des KGs, eine höhere Sterblichkeit und Atrophie in Tubuli, Prostata und Samenbläschen (Dunnick et al., 1984).

8-MOP und 5-MOP zeigten nach oraler Gabe bei männlichen Wistarratten reproduktions- und entwicklungstoxische Eigenschaften, wie die Verminderung des Hypophysengewichts und der Spermienzahl, die Erhöhung des Serum-Testosteronspiegels und des Gewichts der Hoden sowie die Reduzierung der Anzahl der erfolgreichen Begattungen von weiblichen Ratten (Diawara et al., 2001). In weiblichen Ratten waren Dosis-abhängig unter anderem die Verminderung der Geburtenrate und der Nachkommenzahl, sowie die Erniedrigung des Estrogenspiegel zu beobachten, was eine Reduktion der ovarialen Follikelfunktion und der Ovulation bedeutet (Diawara und Kulkosky, 2003).

Furocumarine wie z.B. 8-MOP und 5-MOP bilden nicht kovalente DNA-Komplexe und können reversibel an Serumproteine binden (Artuc et al., 1979; Caffieri, 2001; Dall'Acqua et al., 1978). Sie zeigen ohne Lichteinwirkung eine schwache Mutagenität (Abel und Schimmer, 1981; Ashwood-Smith, 1978; Ivie et al., 1980)

1.4.3.2 Phototoxizität, Photomutagenität und Kanzerogenität

Akute phototoxische Effekte der Furocumarine kombiniert mit Sonnenlicht oder UV-Strahlung am Menschen sind Erytheme und Ödeme, wie sie z.B. an Arbeitern, die Kontakt mit Sellerie hatten, PUVA-Patienten oder auch an Personen, die furocumarinhaltige Nahrungsmittel verzehrt haben, beobachtet wurden (Berkley et al., 1986; Fitzpatrick und Pathak, 1984; Jaspersen-Schib et al., 1996; Ljunggren, 1990).

Furocumarine wie 8-MOP, 5-MOP, Imperatorin und Heraclenin zeigen unter Lichteinfluss genotoxische und mutagene Effekte in verschiedenen Testsystemen (Ashwood-Smith et al., 1980; Babudri et al., 1986; Burger und Simons, 1978; Schimmer und Abel, 1986; Seki et al., 1978). Des Weiteren können 8-MOP und 5-MOP in humanen Lymphozyten Schwesterchro-

matid-Austausche (SCEs) und Chromosomenabberationen hervorrufen (Abel, 1987; Loveday und Donahue, 1984; Löber et al., 1986). Ein schwach klastogenes Potential konnte für Isopimpinellin, 5-MOP und 8-MOP mit UVA-Strahlung nachgewiesen werden (Abel et al., 1985; Ashwood-Smith et al., 1980).

Reproduktions- und entwicklungstoxische Eigenschaften von 8-MOP bzw. 5-MOP mit UVA führten bei weiblichen Ratten unter anderem zu einer Dosis-abhängigen Reduzierung der Geburtenrate und der Nachkommenzahl (Diawara et al., 1999).

Follow Up Studien an PUVA-Patienten zeigten bei oraler Gabe von 8-MOP einen signifikanten Anstieg der Wahrscheinlichkeit des Auftretens von Plattenepithelzellkarzinomen, Basalzellkarzinomen und Melanomen (Armstrong und Krickler, 2001; Frentz und Olsen, 1999; Gasparro et al., 1998; Lindelöf, 1999; Stern, 1998 und 2001; Stern et al., 1998), sowie eine erhöhte Möglichkeit bei Männern, an Genitaltumoren zu erkranken (Stern et al., 2002). Diese Effekte korrelieren mit Anzahl der durchgeführten PUVA-Therapien.

1.4.4 Interaktionen mit Enzymsystemen

Natürlich in Nahrungsmitteln und pflanzlichen Pharmaka vorkommende Furocumarine sind bekannte und selektive Inhibitoren verschiedener CYP-Isoenzyme wie CYP3A4, CYP1A, CYP2C9, CYP2A6 und CYP2D19. Da allerdings auch induktive Effekte beobachtet werden konnten, führte dies zu der Annahme, dass die Inaktivierung dieser Enzyme einem komplexen Mechanismus unterliegt. Furocumarine fungieren dabei zumeist als „Selbstinduktoren“ ihres eigenen Metabolismus durch die inhibierten CYP-Isoenzyme. Die gebildeten reaktiven Metabolite inaktivieren das zuvor induzierte Enzym („Mechanismus-basierte“ Inaktivierung). Dies kann über drei Mechanismen erfolgen: der Alkylierung der prosthetischen Hämgruppe des CYP, der Degradation der prosthetischen Hämgruppe oder der kovalenten Bindung an das Apoprotein. Lineare Furocumarine wie 8-MOP werden am Furanring bioaktiviert und zu elektrophilen Intermediaten wie Epoxiden oder α,β -ungesättigten Aldehyden, die z.B. an Amino- und Sulfhydrylgruppen von Proteinen wie CYP binden können. Sie beeinflussen damit deren Funktionalität, wobei die Art der Intermediate von der Elektronenverteilung im Substratmolekül und nicht vom CYP-Isoenzym abhängt. (Cai et al., 1996; Guo et al., 2000; Königs und Trager, 1998)

8-MOP ist ein Inhibitor der CYP1A, CYP2B1 und CYP2D6 Enzymaktivität (Jeong et al., 1995; Kharasch et al., 2000; Koenigs et al., 1997; Koenigs und Trager, 1982; Labbe et al., 1989; Mays et al., 1989; Taavitsainen et al., 2001). *In vivo* Experimente an Ratten führten jedoch nach Gabe von 8-MOP zu einem Anstieg der mRNA von CYP1A und CYP2B und konnten einen induktiven Effekt auf diese Enzyme belegen (Bickers et al., 1982 und 1998; Gwang, 1996). Mays et al. konnten zeigen, dass 8-MOP an mikrosomales Protein bindet, was durch Königs und Trager bestätigt wurde (Mays et al., 1987, 1989 und 1990; Königs und Trager, 1998; Labbe et al., 1989; Tinel et al., 1987). Sie fanden anhand von massenspektrometrischen Untersuchungen, dass eine Addition von 8-MOP-Furanepoxid an CYP1B1 erfolgen kann (Königs und Trager, 1998). 8-MOP und 5-MOP inhibieren in PUVA-Patienten den CYP1A2 und damit den Koffeinmetabolismus (Bendriss et al., 1996; Mays et al., 1987; Tantcheva-Poor et al., 2001).

Die Inhibition von CYP2D6 durch 8-MOP spielt eine Rolle bei Arzneimittelinteraktionen, der Raucherentwöhnung (Nikotinmetabolismus) und bei der Verminderung des Lungenkrebsrisikos durch Promutagene wie Nitrosamine im Tabakrauch (Kharasch et al., 2000; Szutowski et al., 2002; Takeuchi et al., 2003; Zhang et al., 2001). Imperatorin und Isopimpinellin hemmen die CYP1A/B abhängige metabolische Aktivierung von DMBA und B[a]P (Kleiner et al., 2001, 2002 und 2003). Bergamottin ist ein effektiver Inhibitor der CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A4 und CYP1A Aktivität (He et al., 1998; Sahi et al., 2002; Tassaneeyakul et al., 2000; Wen et al., 2002).

Eine Vielzahl von Studien existiert über die inhibitorischen Wirkungen von Grapefruitsaft auf CYP-Isoenzyme, insbesondere CYP3A4. Die potentesten CYP3A4-Hemmer im Grapefruitsaft sind 6',7'-Dihydroxybergamottin und Furocumarindimere, die in Experimenten sowohl kompetitiv als auch „Mechanismus-basiert“ das Enzym inaktivieren. Die Gehalte der einzelnen Furocumarine in verschiedenen Saftpräparationen ist stark unterschiedlich, außerdem ist das inhibitorische Potential des Saftes höher als die additiven Effekte der einzelnen Furocumarine in gleicher Zusammensetzung, was für weitere inhibitorische Substanzen und Wechselwirkungen oder additive Wirkungen derselben mit den enthaltenen Furocumarinen spricht. Die Pharmakokinetik und Pharmakodynamik zahlreicher Medikamente wie z.B. Felodipin, Nifedipin, Midazolam und Verapamil wird durch Grapefruitsaft beeinflusst, da sie vom Status der CYP-Aktivität abhängig sind. Grapefruitsaft-Arzneimittel-Interaktionen können aufgrund veränderter Bioverfügbarkeit, Plasmaspiegel und Eliminationszeiten der Pharmaka zu unerwünschten Nebenwirkungen, Ausbleiben der Wirkung oder Überdosierungen führen, bieten

aber auch die Option, durch kombinatorische Effekte die Arzneimittelzusammensetzung zu verbessern. Auch andere Furocumarin-haltige Säfte, wie Sellerie- und Petersiliensaft, zeigten in Untersuchungen Interaktionen mit Medikamenten. So verlängert sich die schlafauslösende Wirkung von Pentobarbital in Mäusen nach vorausgehender Gabe dieser Säfte (Jakovljevic et al., 2002; Martin et al., 2003). Allerdings ist die Applikationsart der Pharmaka von Bedeutung, da Effekte häufig bereits im Gastrointestinaltrakt auftreten, während der hepatische Stoffwechsel nur teilweise beeinflusst wird. (Bailey et al., 2000 und 2003; Dresser und Bailey, 2003; Edwards et al., 1999; Fuhr et al., 2002; Greenblatt et al., 2003; Guo et al., 2000 und 2001; Guo und Yamazoe, 2004; Henderson et al., 1999; Ho et al., 2000 und 2001; Malhotra et al., 2001; Ohnishi et al., 2000; Schmiedlin-Ren et al., 1997; Tassaneeyakul et al., 2000)

1.5 Aufgabenstellung

Wie im einleitenden Abschnitt beschrieben, spielen Liganden mit agonistischer und antagonistischer Wirkung auf den AhR eine wichtige Rolle im Fremdstoffmetabolismus und in einer Vielzahl von physiologischen Prozessen. Der Einfluss der AhR-vermittelten Genexpression auf die Kanzerogenese von Xenobiotika ist ebenfalls von besonderem Interesse. Endogene und natürliche, über Nahrungsmittel aufgenommene Liganden sind hierbei entscheidend für den Status des AhR und der AhR-Genexpression, da Lebewesen ständig zum Teil in großer Menge der Exposition dieser Ligandenklasse ausgesetzt sind. Obwohl in den letzten Jahren eine Anzahl von Verbindungen als AhR-aktiv identifiziert wurden, konnte noch kein wirklich potenter endogen gebildeter Ligand gefunden werden. (Denison et al., 2002; Denison und Nagy, 2003; Ma und Whitlock, 1996; Heath-Pagliuso et al., 1998) Potente Liganden aus der Nahrung resultieren aus der Umsetzung von Indolen und Tryptophan im Gastrointestinaltrakt durch Milieu-katalysierte Reaktionen oder die intestinale Mikroflora (Bowden et al., 1976; Perdew und Babbs, 1991). Die Kenntnis ihrer Strukturen und charakteristischen Wirkungen ist wichtig zum Verstehen der evolutionären und physiologischen Bedeutung des AhR.

Natürlich vorkommende Furocumarine in Lebensmitteln sind bekannte photoaktive Substanzen und Inhibitoren von CYP-Isoenzymen, u.a. von CYP1A. Welche Rolle die Regulation des AhR bei der Inhibition von CYP1A durch z.B. 8-MOP spielt, ist nicht eindeutig geklärt. Die

Photoreaktivität und strukturelle Ähnlichkeiten der Furocumarine mit bekannten AhR-Liganden wie Indolderivaten führten zu der Annahme, dass Interaktionen dieser Verbindungen oder endogen gebildeter Metabolite mit dem AhR-Signaltransduktionsweg erfolgen können. (Cai et al., 1996; Guo et al., 2000; Jeong et al., 1995; Königs und Trager, 1998)

In dieser Arbeit wurden daher folgende Fragestellungen untersucht:

1) Untersuchung von Furocumarinen in bezug auf ihren Einfluss auf den AhR-Signaltransduktionsweg und dessen Lichtabhängigkeit

Ausgewählte natürlich in pflanzlichen Lebensmitteln vorkommende Furocumarine sollten im EROD-Assay auf ihre inhibitorischen Effekte auf die CYP1A Expression in verschiedenen Systemen untersucht werden. Des Weiteren sollte mittels Reportergenexperimenten und Bestimmung der *CYP1A1* mRNA und Protein Expression geklärt werden, ob und wie der AhR-Signalweg an der Regulation der CYP1A Aktivität beteiligt ist. Generell sollte hierbei gezeigt werden, ob Lichteinfluss zu einer Änderung der Interaktionen dieser Substanzen mit dem untersuchten regulatorischen System führt.

2) Optimierung der Fermentation von Tryptophan mit Rattenfeces und Isolierung von AhR-Agonisten

Tryptophan wurde einer Fermentation mit frischer Rattenfeces unterworfen. Die erhaltene Lösung wurde extrahiert, aufgereinigt und mittels EROD-Assay auf AhR-Liganden gescreent. Die Anreicherung und Isolierung der AhR-aktiven Substanzen sollte per HPLC-Analyse erfolgen. Dabei sollen die einzelnen Verfahrensschritte optimiert werden mit dem Ziel, die Ausbeute und Reinheit der AhR-Agonisten zu erhöhen und eine Charakterisierung einzelner AhR-aktiver Tryptophan-Metabolite zu ermöglichen.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Materialien

2.1.1 Zellen

2.1.1.1 H4IIE-Zelllinie

Die Ratten-Hepatom-Zelllinie H4IIE stammt ursprünglich von dem Reuber H-35 Hepatom ab, welches in männlichen Ratten durch Gabe von 2-Acetylaminofluoren induziert wurde (Reuber, 1961). Die H4IIE-Zellen wurden von Pitot als kontinuierliche Zelllinie etabliert (Pitot et al., 1964).

2.1.1.2 Versuchstiere

Die Rattenleberperfusionsen zur Gewinnung der benötigten Primärhepatozyten wurden an adulten männlichen Wistar-Ratten mit einem Körpergewicht von 150-200 g durchgeführt. Die Haltung der Tiere erfolgte im Tierhaus der Universität Kaiserslautern in Makrolon-Käfigen unter künstlichen Tag-Nacht-Lichtverhältnissen (12 h-Rhythmus). Sie hatten freien Zugang zu Trinkwasser und Trockenfutter (Altromin, Lage).

2.1.2 Chemikalien und Reagenzsysteme

Tabelle 2.1: Alphabetische Auflistung von Chemikalien*, Reagenzsystemen und kompetenten Zellen

| Chemikalie/Reagenz | Firma, Ort |
|---|--------------------|
| (α - 32 P)-dCTP und (γ - 32 P)-ATP | ICN, Eschwege |
| 2,3,7,8- TCDD | Promochem, Wesel |
| 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-p-dioxin (TCDD) | Prochem, Wesel |
| 8-MOP | Sigma, Deisenhofen |
| Acetonitril für HPLC | Roth, Karlsruhe |
| Acrylamid : Bisacrylamid (30:0,8) | Roth, Karlsruhe |
| Agarose zur DNA/RNA-Elektrophorese ('e- lectrophoresis grade' und LMP) | Peqlab, Erlangen |
| Ammoniumperoxodisulfat (APS) | Merck, Darmstadt |

| Chemikalie/Reagenz | Firma, Ort |
|--|------------------------|
| Ampicillin | Sigma, Deisenhofen |
| AMV Reverse Transkriptase und RT-Puffer (5x) | Promega, Mannheim |
| Angelicin | Roth, Karlsruhe |
| Bacto-Agar | Difco, Detroit (USA) |
| Bacto-Trypton | Difco, Detroit (USA) |
| Bakterienstämme (kompetent): | |
| HB101, JM109 | Promega, Mannheim |
| XL 10-Gold | Stratagene, Heidelberg |
| BCA Protein Assay Kit | Pierce, Rockford (USA) |
| Bergamottin | Roth, Karlsruhe |
| BioRad DC Protein Assay | BioRad, München |
| BioRad Kaleidoskope Prestained Standards | BioRad, München |
| Borsäure | Merck, Darmstadt |
| Bromphenolblau | Sigma, Deisenhofen |
| BSA (Fraktion V) | Roth, Karlsruhe |
| Chloroform | Merck, Darmstadt |
| Desoxynukleotide, PCR-grade | Roth, Karlsruhe |
| Dexamethason | Sigma, Deisenhofen |
| Dicumarol | Sigma, Deisenhofen |
| Diethylpyrocarbonat (DEPC) | Sigma, Deisenhofen |
| di-Kaliumhydrogenphosphat | Merck, Darmstadt |
| Dimethylformamid (DMF) | Sigma, Deisenhofen |
| Dimethylsulfoxid (DMSO) | Merck, Darmstadt |
| di-Natriumhydrogenphosphat | Merck, Darmstadt |
| Dinatriumhydrogenphosphat x 2 H ₂ O | Merck, Darmstadt |
| Dithiothreitol (DTT) | Sigma, Deisenhofen |

| Chemikalie/Reagenz | Firma, Ort |
|--|----------------------------------|
| DMEM (low glucose) | Biochrom, Berlin |
| | PAA, Cölbe |
| | Sigma, Deisenhofen |
| DNA-Ladder (1kb) | Gibco BRL, Karlsruhe |
| | Peqlab, Erlangen |
| Dual Luciferase TM Reporter Assay System | Promega, Mannheim |
| EDTA x 2 H ₂ O | Roth, Karlsruhe |
| Entwicklerkonzentrat für Röntgenfilme | Ilford, Dreieich |
| Essigsäure 100% | Roth, Karlsruhe |
| Ethanol | Roth, Karlsruhe |
| Ethidiumbromid-Lösung 1% (10 mg/ml) | Roth, Karlsruhe |
| Ethoxyresorufin | Merck, Darmstadt |
| Ethylacetat | Mallinkrodt Baker B.V., Deventer |
| Ethylenglykol | Roth, Karlsruhe |
| Ficoll 400 | Sigma, Deisenhofen |
| Fixierlösung-Konzentrat für Röntgenfilme | Ilford, Dreieich |
| Fluorescamin | Molecular Probes, Leiden |
| Folin-Ciocalteus-Reagenz | Merck, Darmstadt |
| Formaldehyd-Lösung (37%) | Merck, Darmstadt |
| Formamid | Roth, Karlsruhe |
| Fötales Kälberserum (FKS) bzw. | Gibco BRL, Karlsruhe |
| Hitze-inaktiviertes FKS | Sigma, Deisenhofen |
| Gel loading solution | Sigma, Deisenhofen |
| Gen Elute TM Endotoxin-free Plasmid Maix- prep Kit | Sigma, Deisenhofen |
| Glucose | Merck, Darmstadt |
| Glutamin-Lösung [200 mM] für Zellkultur | Gibco BRL, Karlsruhe |
| Glyzerin | Merck, Darmstadt |
| Glyzin | Merck, Darmstadt |
| Guanidiniumthiocyanat | Merck, Darmstadt |
| HEPES | Roth, Karlsruhe |
| IDH | Sigma, Deisenhofen |

| Chemikalie/Reagenz | Firma, Ort |
|---|--|
| Igepal | Sigma, Deisenhofen |
| Indol | Merck, Darmstadt |
| IQ TM SYBR Green Supermix | BioRad, München |
| iScript TM cDNA Synthesis Kit | BioRad, München |
| Isoamylalkohol | Roth, Karlsruhe |
| Isocitratdehydrogenase | Sigma, Deisenhofen |
| Isopimpinellin | Roth, Karlsruhe |
| Isopropanol | Merck, Darmstadt |
| Kaliumchlorid | Merck, Darmstadt |
| Kaliumdihydrogenphosphat | Riedel-de Haën Laborchemikalien, Seelze |
| Kalziumchlorid x 2 H ₂ O | Merck, Darmstadt |
| Kupfersulfat | Merck, Darmstadt |
| Magnesiumchlorid x 6 H ₂ O | Merck, Darmstadt |
| Magnesiumsulfat x 7 H ₂ O | Merck, Darmstadt |
| Mercaptoethanol | Serva, Heidelberg |
| Methanol | Merck, Darmstadt |
| Methanol (HPLC) | Roth, Karlsruhe |
| MTT | Sigma, Deisenhofen |
| N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED) | Serva, Heidelberg |
| NADH | AppliChem, Darmstadt |
| NADPH | AppliChem, Darmstadt |
| Natriumacetat | Merck, Darmstadt |
| Natriumbutyrat | Sigma, Deisenhofen |
| Natriumcarbonat | Merck, Darmstadt |
| Natriumchlorid | Roth, Karlsruhe |
| Natriumcitrat x 2 H ₂ O | Merck, Darmstadt |
| Natriumdihydrogenphosphat | Merck, Darmstadt |
| Natriumdodecylsulfat (SDS) | Serva, Heidelberg |
| Natriumhydrogencarbonat | Merck, Darmstadt |
| Natriumhydroxid-Lösung [1 M] | Merck, Darmstadt |
| Natriumthiosulfat | Merck, Darmstadt |

| Chemikalie/Reagenz | Firma, Ort |
|---|--|
| Natrumisocitrat | Sigma, Deisenhofen |
| Oligonukleotide für PCR und EMSA | MWG Biotech, Ebersberg |
| p(dT) ₁₅ Primer (reverse Transkription) | Roche, Mannheim |
| PCR-H ₂ O Ampuwa [®] | Fresenius, Bad Homburg |
| PCR-Reagenzien (Taq Polymerase, Puffer (10x) ohne Magnesium, Magnesiumchlorid-Lösung (50 mM)) | Gibco BRL, Karlsruhe |
| Penicillin/Streptomycin | Biochrom Seromed, Berlin |
| Pentobarbital | Sigma, Deisenhofen |
| Phenol | Roth, Karlsruhe |
| Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) | Sigma, Deisenhofen |
| poly dI-dC | Amersham Pharmacia Biotech, Heidelberg |
| Polyethylenglykol, 50% | Clontech, Palo Alto (USA) |
| Proteinase K | Roche, Mannheim |
| QIAfilter Plasmid Maxi Kit | Qiagen, Hilden |
| QIAprep Spin Miniprep Kit | Qiagen, Hilden |
| Resorufin | Sigma, Deisenhofen |
| Restriktionsendonukleasen und Puffer | MBI Fermentas, St. Leon-Rot |
| | Roche, Mannheim |
| | Promega, Mannheim |
| RNAasin | Promega, Mannheim |
| Saccharose | Roth, Karlsruhe |
| Salpetersäure 65% | Merck, Darmstadt |
| Salzsäure | Merck, Darmstadt |
| SDS | AppliChem, Darmstadt |
| Silbernitrat | Merck, Darmstadt |
| T4 Polynucleotide Kinase | Promega, Mannheim |
| Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris) | Roth, Karlsruhe |
| Triton X-100 | Sigma, Deisenhofen |
| Trypanblau | Sigma, Deisenhofen |
| Trypsin EDTA-Lösung (1x) | Biochrom, Berlin |
| Tryptophan | Sigma, Deisenhofen |

| Chemikalie/Reagenz | Firma, Ort |
|----------------------|----------------------|
| Western Lighting Kit | Perkin-Elmer, Rodgau |
| Yeast-Extract | Difco, Detroit (USA) |
| Zinkchlorid | Sigma, Deisenhofen |

* alle aufgelisteten Chemikalien entsprechen der Qualitätsstufe p.A.

2.1.3 Lösungen

Aufgeführt werden nur solche Lösungen, die mehr als eine Substanzkomponente enthalten und nicht fertig gekauft wurden. Soweit nicht anders angegeben, wird H₂O bidest als Lösungsmittel verwendet.

2.1.3.1 Perfusionslösungen für Primärhepatozyten

| | | |
|---------------------|---|--------|
| Perfusionslösung 1: | NaCl | 130 mM |
| | KCl | 5,6 mM |
| | MgSO ₄ x 7H ₂ O | 1 mM |
| | NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O | 1 mM |
| | NaHCO ₃ | 25 mM |
| | HEPES | 10 mM |
| | Glucose x H ₂ O | 5 mM |
| | EGTA | 0,1 mM |
| | ad H ₂ O bidest | 5 l |
| | pH 7,2 | |
| | Sterilfiltration | |
| | Lagerung bei 4°C | |

| | | |
|---------------------|---|--------|
| Perfusionslösung 2: | DMEM | 500 ml |
| | HEPES (1M) | 5 ml |
| | Kollagenase (20 000 U) | 50 mg |
| | Lagerung bei 4°C | |
| | Kollagenase erst kurz vor Verwendung zusetzen | |

| | | |
|--------------------------|-------------------------|--------|
| Waschpuffer (Perfusion): | DMEM / F12 | 400 ml |
| | FKS | 100 ml |
| | HEPES (1M) | 5 ml |
| | Penicillin/Streptomycin | 5 ml |
| | Lagerung bei 4°C | |

| | | |
|-------------|---------------------------------|-------|
| Trypanblau: | sterile Fertiglösung | |
| | Trypanblau | 0,4% |
| | NaCl | 0,81% |
| | KH ₂ PO ₄ | 0,06% |
| | Lagerung bei Raumtemperatur | |

2.1.3.2 Nährmedien

2.1.3.2.1 Kulturmedien für Zellen

| | | |
|---------------------|-----|-----|
| H4IIE-Kulturmedium: | FKS | 20% |
|---------------------|-----|-----|

| | | |
|--|-------------------------|---------|
| | Dexamethason (0,1 mM) | 0,1% |
| | Penicillin/Streptomycin | 1% |
| | DMEM-Fertiglösung | ad 100% |
| | Lagerung bei 4°C | |

Hepa1/HepG2-
Kulturmedium:

| | | |
|--|-------------------------|---------|
| | FKS | 10% |
| | Penicillin/Streptomycin | 1% |
| | DMEM-Fertiglösung | ad 100% |
| | Lagerung bei 4°C | |

Einfriermedium:

| | | |
|--|------|-----|
| | FKS | 88% |
| | DMSO | 12% |

2.1.3.2.2 Kulturmedien für Bakterienkulturen

LB-Medium (pH 7,0):

| | | |
|--|-----------------------------|------|
| | Bacto-Trypton | 10 g |
| | NaCl | 10 g |
| | Yeast-Extrakt | 5 g |
| | ad H ₂ O bidest. | 1 l |

autoklavieren, vor Verwendung Ampicillin-Lösung zugeben
(Endkonzentration 100 µg/ml)

| | | |
|------------------|---|----------|
| LB-Agar-Platten: | Bacto-Agar | 2% (w/v) |
| (Ampicillin) | in LB-Medium | |
| | nach Autoklavieren und Abkühlen auf ca. 50 °C Zugabe von Ampicillin-Lösung (Endkonzentration 100 µg/ml) | |

| | | |
|----------------------|----------------------------|------|
| 2YT-Medium (pH 7,0): | Bacto-Trypton | 16 g |
| | NaCl | 5 g |
| | Yeast-Extrakt | 10 g |
| | ad H ₂ O bidest | 1 l |

2.1.3.3 Lösungen für EROD-Assay

| | | |
|----------------------|----------------------------|--------|
| Tris/Sucrose-Puffer: | Tris | 10 mM |
| | Saccharose | 250 mM |
| | ad H ₂ O bidest | 1 l |
| | pH 7,4 | |
| | Lagerung bei 4°C | |

| | | |
|--------------|---------------------------------------|---------|
| EROD-Puffer: | Tris | 250 mM |
| | MgCl ₂ x 6H ₂ O | 13 mM |
| | EDTA | 0,15 mM |
| | Na-Isocitrat | 13 mM |

| | | |
|-------------------------------|--|--------|
| | ad H ₂ O bidest | 100 ml |
| | pH 7,4 | |
| | Lagerung bei 4°C | |
| IDH-Lösung: | IDH | 10 mg |
| | Glyzerin | 500 µl |
| | ad H ₂ O bidest, steril | 500 µl |
| | Lagerung bei 4°C | |
| | Verdünnung vor Gebrauch | |
| | 1 : 3,6 mit H ₂ O bidest | |
| NaP-Puffer: | Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O | 8,44 g |
| | NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O | 0,36 g |
| | ad H ₂ O bidest | 1 l |
| | pH 8,0 | |
| | autoklavieren | |
| | Lagerung bei 4°C | |
| Fluorescamin- Stammlösung: | Fluorescamin | 100 mg |
| | Acetonitril | 333 ml |

lichtgeschützt

Lagerung bei 4°C

| | | |
|--------------|------------------------|--------|
| ERDC-Medium: | ER/D-Lösung (2 mM) | 100 µl |
| | DC-Lösung (2 mM) | 125 µl |
| | ad H4IIE-Medium | 25 ml |
| | Steril, lichtgeschützt | |
| | Frisch ansetzen | |

2.1.3.4 Zytotoxizitätstests

| | | |
|---------------|---------------------------------|-------|
| LDH-P-Puffer: | K ₂ HPO ₄ | 50 mM |
| | KH ₂ PO ₄ | 8 mM |
| | pH 7,4 | |
| | Lagerung bei 4°C | |

| | | |
|-----------------|-------------------|-------|
| Pyruvat-Lösung: | Pyruvat | 48 mM |
| | in LDH-P-Puffer | |
| | Frisch herstellen | |

| | | |
|--------------|-----------------|------|
| NADH-Lösung: | NADH | 3 mM |
| | in LDH-P-Puffer | |

lichtgeschützt

Frisch herstellen

2.1.3.5 Lösungen zur Proteinbestimmung

| | | |
|----------------|--------------------------------------|-----------|
| LowryA-Lösung: | Na ₂ CO ₃ (2%) | 100 Teile |
|----------------|--------------------------------------|-----------|

| | | |
|--|---------------------|--------|
| | Na-K-Tartrat (2,7%) | 1 Teil |
|--|---------------------|--------|

| | | |
|--|------------------------|--------|
| | CuSO ₄ (1%) | 1 Teil |
|--|------------------------|--------|

| | | |
|----------------|--------------------------|--------|
| LowryB-Lösung: | Folin-Ciocalteus-Reagenz | 1 Teil |
|----------------|--------------------------|--------|

| | | |
|--|-------------------------|--------|
| | H ₂ O bidest | 1 Teil |
|--|-------------------------|--------|

2.1.3.6 RNA-Isolierung

| | | |
|---------------|------|-------|
| Lysis-Puffer: | NaCl | 0,5 M |
|---------------|------|-------|

| | | |
|--|------|-------|
| | Tris | 10 mM |
|--|------|-------|

| | | |
|--|------|------|
| | EDTA | 2 mM |
|--|------|------|

| | | |
|--|--------|----|
| | Igepal | 1% |
|--|--------|----|

| | | |
|--|----------------|------|
| | Na-Deoxycholat | 0,5% |
|--|----------------|------|

| | | |
|--|-------------------|----|
| | β-Mercaptoethanol | 1% |
|--|-------------------|----|

pH 7,5

autoklavieren

Lagerung bei 4°C

Zusatz von β -Mercaptoethanol erst vor Gebrauch

2.1.3.7 Transfektion von Plasmiden

Alle Lösungen wurden sterilfiltriert.

| | | |
|--------------------------|----------------------------------|--------|
| PBS-Puffer (TF; pH 7,4): | KCl | 0,2 g |
| | NaCl | 8,0 g |
| | KH ₂ PO ₄ | 0,2 g |
| | Na ₂ HPO ₄ | 1,15 g |
| | ad H ₂ O bidest | 1 l |

| | | |
|--------------------------|---|--------|
| HBS-Puffer (2x; pH 7,4): | HEPES | 50 mM |
| | NaCl | 280 mM |
| | Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O | 1,5 mM |

2.1.3.8 Lösungen für Kernextrakt-Gewinnung und EMSA

| | | |
|------------|----------------------------|------------------|
| TBE (10x): | Tris | 108 g |
| | Borsäure | 55 g |
| | EDTA | 40 ml 0,5 M EDTA |
| | ad H ₂ O bidest | 1 l |
| | autoklavieren | |

| | | |
|----------------------|-------------------|-------|
| MDH-Puffer (pH 7,6): | HEPES | 25 mM |
| | MgCl ₂ | 3 mM |
| | DTT | 1 mM |
| | PMSF | 1 mM |

TNE-Puffer

| | | |
|-----------------|------|--------|
| (10x; pH 7,8) : | Tris | 100 mM |
| | NaCl | 1 M |
| | EDTA | 10 mM |

| | | |
|----------------------|--------|--------|
| TGE-Puffer (pH 8,5): | Tris | 50 mM |
| | EDTA | 2 mM |
| | Glycin | 375 mM |

| | | |
|-------------|---------------|-------|
| TE-Puffer : | Tris | 10 mM |
| | EDTA | 1 mM |
| | pH 8,0 | |
| | autoklavieren | |

EMSA-Gele:

Die Gele wurden im Gelgießsystem JoeyTM JGC-2 hergestellt.

Tabelle 2.2: Polyacrylamidgele für EMSA (Angaben pro Gel)

| | | |
|-------------------------------------|---------|--------|
| Gelstärke | 4% | 6% |
| TBE (10 x) | 5 ml | 5 ml |
| H ₂ O bidest | 38,3 ml | 35 ml |
| Acrylamid : Bisacrylamid (30 : 0,8) | 6,7 ml | 10 ml |
| APS (10%) | 300 µl | 300 µl |
| TEMED | 16 µl | 16 µl |

Inkubationspuffer:

| | | |
|--|-------------------|--------|
| Puffer 1 (5x) : | Tris | 5 mM |
| | NaCl | 25 mM |
| | EDTA | 2,5 mM |
| | MgCl ₂ | 5 mM |
| | Glyzerin | 20% |
| Lagerung bei 4°C | | |
| Vor Gebrauch Zugabe von 1 mM DTT und 0,25 µg/µl pdI-dC | | |

| | | |
|-----------------------|----------|--------|
| Puffer 2 (HEDG) (5x): | HEPES | 125 mM |
| | EDTA | 7,5 mM |
| | Glyzerin | 50% |
| Lagerung bei 4°C | | |

Vor Gebrauch Zugabe von 1 mM DTT

| | | |
|------------------------|-------------------|---------|
| Puffer 3 (5x): | HEPES | 30 mM |
| (nach | MgCl ₂ | 2,25 mM |
| Backlund et al., 1997) | EDTA | 200 mM |
| | KCl | 0,2 mM |

- Lagerung bei 4°C

Vor Gebrauch Zugabe von 20% Glyzerin, 0,12 mM PMSF, 0,5 mM DTT und 0,05 µg/µl pdI-dC

2.1.3.9 Proteinisolierung und Western Blot

| | | |
|----------------|--|--------|
| Schwellpuffer: | Tris | 10 mM |
| | NaCl | 10 mM |
| | MgCl ₂ x 6 H ₂ O | 1,5 mM |
| | NaN ₃ | 0,05% |
| | DTT | 1% |
| | PMSF | 1% |

pH 7,4; steril

Lagerung bei 4°C

Zusatz von DTT und PMSF erst
direkt vor Gebrauch

| | | |
|------------------|------------------|--------|
| Anodenpuffer I: | Tris | 0,3 M |
| | Methanol | 1 % |
| | pH 7,4 | |
| | Lagerung bei 4°C | |
| Anodenpuffer II: | Tris | 25 mM |
| | Methanol | 10% |
| | pH 10,4 | |
| | Lagerung bei 4°C | |
| Kathodenpuffer: | Tris | 25 mM |
| | Glyzin | 40 mM |
| | Methanol | 20% |
| | SDS | 0,05% |
| | pH 9,4 | |
| | Lagerung bei 4°C | |
| TBS : | Tris | 10 mM |
| | NaCl | 140 mM |
| | pH 7,4 | |

| | | |
|-----------------------|----------------------------|--------|
| TBS-T: | Tween-20 | 0,1% |
| | in TBS | |
| | pH 7,4 | |
| Elektrophoresepuffer: | Tris | 30 g |
| | Glyzin | 144 g |
| | SDS (10%) | 50 ml |
| | ad H ₂ O bidest | 5 l |
| | pH 8,3 | |
| Lämmli-Puffer: | Tris (1,2 M) | 100 µl |
| | SDS (10%) | 100 µl |
| | β-Mercaptoethanol | 20 µl |
| | Bromphenolblau (0,05%) | 40 µl |
| | aliquotieren | |
| | Lagerung bei –20°C | |

Gelzusammensetzung:

Tabelle 2.3: Polyacrylamidgele für Western Blot (Trenngel; Ansatz für 2 Gele)

| | | |
|-------------------------|--------|--------|
| Trenngel | 10% | 12% |
| H ₂ O bidest | 7,9 ml | 6,6 ml |

| | | |
|-------------------------------------|--------|--------|
| Acrylamid : Bisacrylamid (30 : 0,8) | 6,7 ml | 8 ml |
| Tris (1,5 M; pH 8,8) | 5 ml | 5 ml |
| SDS (10%) | 0,2 ml | 0,2 ml |
| APS (10%) | 0,2 ml | 0,2 ml |
| TEMED | 8 µl | 8 µl |

Tabelle 2.4: Polyacrylamidgele für Western Blot (Sammelgel; Ansatz für 2 Gele)

| | | |
|-------------------------------------|---------|--------|
| Sammelgel | 4% | 6% |
| H ₂ O bidest | 4,1 ml | 5,3 ml |
| Acrylamid : Bisacrylamid (30 : 0,8) | 1 ml | 2 ml |
| Tris (1 M; pH 6,8) | 0,75 ml | 5 ml |
| SDS (10%) | 60 µl | 100 µl |
| APS (10%) | 60 µl | 100 µl |
| TEMED | 5 µl | 5 µl |

Antikörper:

Primärer Antikörper: monoklonal; CYP1A1 1A3-03 Rubitec, Bochum

Sekundärer Antikörper: AntiMouse 31432 Pierce Immuno Pure, USA

2.1.3.10 RT-PCR**Tabelle 2.5: Polyacrylamidgele für RT-PCR (Ansatz pro Gel)**

| Gelzusammensetzung | |
|-------------------------------------|---------|
| H ₂ O bidest | 31,4 ml |
| TBE (10x) | 5 ml |
| Acrylamid : Bisacrylamid (30 : 0,8) | 13,3 ml |
| APS (10%) | 350 µl |
| TEMED | 18 µl |

2.1.3.11 Topoisomerase-Assays

| | | |
|--------------|-------------------|--------|
| Salt Mix I: | MgCl ₂ | 100 mM |
| | DTT | 5 mM |
| | EDTA | 5mM |
| | BSA | 0,3 mM |
| Salt Mix II: | MgCl ₂ | 100 mM |
| | DTT | 5 mM |
| | EDTA | 5mM |
| | ATP | 10 mM |
| | BSA | 0,3 mM |

| | | |
|-------------------|-------------------------|---------|
| TAE-Puffer (50x): | Tris | 242 g |
| | Eisessig | 57,1 ml |
| | EDTA (0,5 M; pH 8,0) | 100 ml |
| | H ₂ O bidest | ad 1 l |

2.1.3.12 Fermentationslösungen

| | | |
|----------------------|----------------------------------|-------|
| Fermentationspuffer: | Na ₂ HPO ₄ | 5,5 g |
| | NaH ₂ PO ₄ | 2,7 g |
| | ad H ₂ O bidest | 1 l |
| | pH 7,1-7,4 | |
| | autoklavieren | |
| | Lagerung bei RT | |

2.1.4 Geräte und Materialien

Tabelle 2.6: Verwendete Materialien und Geräte

| Gerät | Bezeichnung | Firma, Ort |
|----------------------|--|---|
| Autoklav | Varioklav [®] , Dampfsterilisator | H+P Labortechnik GmbH, |
| | Typ500 | München |
| | Dampfdrucktopf | Lacher Großküchen GmbH, Darmstadt |
| Bakterienbrutschrank | Köttermann [®] 2737 | Köttermann Labortechnik, Uetze, Hönigsen |
| Bakterienschüttler | TH 30/SM 30 | Johanna Otto GmbH, Hechingen |

| | | |
|---------------------------------|-----------------------------------|---|
| Bakterienfilter | Celluloseacetat (0,45µm) | Satorius, Göttingen |
| Biofreezer | MDF-U6086S | Sanyo, München |
| Brutschrank | Heraeus 6000 | Heraeus, Hanau |
| Druckinfusionsgerät | BVP ismatec | Ismatec Labortechnik, Zürich |
| Elektrophoresekammern | Horizon [®] 11·14 | Gibco BRL, Eggenstein |
| | Penguin [™] P9DS | Owl Scientific, Woburn |
| | Easy-Cast [™] Model #B1A | (USA) |
| | V15·17 | AGS, Heidelberg |
| | | Gibco BRL, Eggenstein |
| ELISA Reader | Model 450 | BioRad, München |
| Filme | Hyperfilm [™] MP (GB) | Amersham Pharmacia Bio- tech, Buckinghamshire (UK) |
| Filmkassetten | X-Omatic | Kodak, Stuttgart |
| Fluoreszenzspektrometer | Perkin-Elmer LS-5B | Perkin-Elmer, Überlingen |
| Geldokumentationssystem | EAGLE EYE [™] II | Stratagene, Heidelberg |
| | LumiImager [™] | Roche, Mannheim |
| Gelgießsystem | Joey [™] JGC-2 | Owl Scientific, Woburn (USA) |
| Geltrockner mit Membranpumpe | Maxidry D64 | Biometra, Göttingen |
| HPLC | Beckman System Gold | Beckman, München |
| | 125 Solvent Module | |
| | 168 Detektor | |
| Kühlsystem für Penguin P9DS | K20 mit Pumpe DC 3 | Haake, Karlsruhe |
| Luminometer | Lumat LB 9507 | Berthold, Bad Wildbad |
| Mikroskop | Axiovert 25 | Zeiss, Jena |
| | Leica DM IRB | Leica, Wetzlar |
| NanoDrop | Agilent Technologies | Kisher, Steinfurt |
| Netzgeräte | ST 606 T | Gibco BRL, Heidelberg |

| | | |
|---|-----------------------------------|---|
| | ST 305 | Gibco BRL, Heidelberg |
| | PS 3002 | Gibco BRL, Heidelberg |
| | LKB-GPS 200/400 | Pharmacia, Freiburg |
| Peristaltische Pumpe | Lauda T | Lauda GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen |
| pH Meter | Φ 300 pH-Meter | Beckman, München |
| Photometer | Spectrophotometer Kontron | Kontron Instruments, Mün- chen |
| | Uvikon 930 | |
| | Beckman UV-DU 640 | Beckman, München |
| Plattenreader | Fluoroskan Ascent FL | Labsystems |
| Radioaktivitätsdetektor | Handmonitor LB 122 | Berthold, Bad Wildbad |
| Rotationsverdampfer | Büchi Rotavapor R | Büchi Laboratoriumstechnik, Flawil |
| Säulen für die Aufreinigung radioaktiv markierter Sonden | mini Quick Spin™ Columns | Roche, Mannheim |
| Schüttelwasserbad | Typ 1083 | GFL, Burgwedel |
| Sterilbank | Gelaire Flow Laboratories | Flow Laboratories, Mecken- heim |
| | BSB 4A | |
| | BDK | BDK, Sonnenbühl-Genkingen |
| Thermocycler | GeneAmp® PCR System 9700 | Perkin Elmer, Lincoln (USA) |
| | iCycler | BioRad, München |
| | Genius | Techne, Cambridge (UK) |
| Ultraschallbad | Transsonic T 460H | Bender & Hobein, Singen |
| Ultraschallsonde | Labsonic 2000 mit Nadelson- de | Braun, Reutlingen |
| Waagen | BP 2105 | Sartorius, Göttingen |
| | BP 410S | Sartorius, Göttingen |
| | EP 400 | Bosch, Jungingen |
| Western Blotting | | |

| | | |
|------------------|----------------------------|--|
| Gel-Kammern | MINI PROTEAN II™ | BioRad, München |
| Semi-Dry-Blotter | Hoeffer TE 77 | Amersham Bioscience, San Francisco (USA) |
| Zentrifugen | Microfuge® R Centrifuge | Beckman, München |
| | Beckman GS-6R Centrifuge | Beckman, München |
| | Beckman J2-21 | Beckman, München |
| | Optima™ TL Ultracentrifuge | Beckman, München |
| | Sorvall Discovery 90SE | Kendro, Langensfeld |

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Die verwendeten Zellen wurden generell im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

2.2.1.1 Kollagenbeschichtung der Kulturflächen

Nach Präparation der Kollagenfasern aus enthäuteten Rattenschwänzen werden diese zunächst 4 h unter Rotlicht getrocknet und anschließend unter UV-Licht über Nacht sterilisiert. Die Kollagenfasern sind in dieser Form bei –20°C lagerbar. 500 mg steriler Kollagenfasern werden in 440 ml 0,05%iger Essigsäure mindestens 12 h gerührt. Zur Sedimentierung ungelöster Bestandteile wird die Suspension über Nacht bei 4°C und 3500 g zentrifugiert.

Die erhaltene Kollagenlösung wird zur Benetzung der Kulturplatten verwendet. Die Lagerung erfolgt bei 4°C.

Die benötigten Kulturplatten werden unter der Sterilbank geöffnet. Eine Platte wird zu ca. 1/3 mit Kollagenlösung gefüllt und diese dann sukzessiv in die nächste Platte abgegossen. Der verbleibende Kollagenfilm bildet die Beschichtung, welche unter UV-Licht über Nacht getrocknet wird.

2.2.1.2 Kultivierung und Passagierung von Zelllinien

Die Zelllinie H4IIE wird auf kollagenierten 90 mm-Petrischalen mit 7 ml H4IIE-Kulturmedium kultiviert. Der Medienwechsel erfolgt alle 2 Tage. Bei 100%iger Konfluenz wird das Medium vollständig abgesaugt und die Zellen mit 3 ml 1x Trypsin/EDTA versetzt. Nach Inkubation im Brutschrank bei 37°C für 5-10 Minuten wird die Enzymreaktion durch Zugabe von 7 ml Medium gestoppt, sobald die Zellen sich deutlich vom Schalenboden lösen. Anschließend werden die Zellen mit einer Pipette von der Platte abgelöst und aufgenommen. Je nach Verwendungszweck wird die Zellsuspension in Kulturmedium verdünnt und auf kollagenierte Platten unterschiedlicher Größe verteilt. Der erste Medienwechsel erfolgt nach 24 h.

2.2.1.3 Einfrieren von Zellen

Eine konfluente Schale wird wie oben beschrieben trypsiniert und die Zellen in einem sterilen Zentrifugenröhrchen bei 4°C und 500 g für 5 min zentrifugiert. Nach Absaugen des überstehenden Mediums wird das Zellpellet in 1 ml eisgekühltem Einfriermedium resuspendiert und in ein steriles Einfrier Röhrchen überführt. Das Röhrchen wird zunächst bei –80°C vorgefroren und dann in flüssigem Stickstoff gelagert.

2.2.1.4 Auftauen von Zellen

Ein Einfrier Röhrchen wird aus dem flüssigen Stickstoff entnommen und zügig aufgetaut. Der Inhalt wird sofort in ein mit 30 ml Kulturmedium gefülltes Zentrifugenröhrchen pipettiert und 3 min bei 1000 g zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wird das Zellpellet in 1 ml Kulturmedium suspendiert und auf eine 90 mm-Platte mit 6 ml Medium transferiert. Nach 24 h erfolgt ein Medienwechsel, die weitere Kultivierung wird wie beschrieben durchgeführt.

2.2.2 Präparation von Rattenhepatozyten

2.2.2.1 Durchführung der Leberperfusion

Die Präparation wird grundlegend nach einer von Seglen entwickelten Methode durchgeführt (Seglen, 1976), welche von Vetter und Schmitz modifiziert wurde (Schmitz, 1994).

Alle verwendeten Materialien und Lösungen werden vor Beginn der Präparation sterilisiert.

Die benötigten Perfusionslösungen 1 und 2 werden in einem Wasserbad auf 42°C temperiert, der Waschpuffer auf 37°C.

Die Leberentnahme findet am mit Nembutal (33 mg Pentobarbital-Na/ml; 300 µl/100 g Körpergewicht) i.p. anästhesierten Tier statt. Zur Kontrolle der Narkose wird der sogenannte Bauchmuskelreflextest verwendet, bei dem die Kontraktion der Bauchmuskulatur durch Zusammendrücken der Schwanzwurzel eine nicht vollständig eingetretene Betäubung anzeigt.

Die Bauchhöhle wird bis zum Sternum geöffnet und die Leber mit ihren Gefäßsystemen freigelegt. Es werden nun zwei lose Ligaturen, eine etwa 1 cm unterhalb der Leberpforte um die Vena porta und eine zweite um die Vena cava inferior oberhalb des Abgangs der rechten Vena renalis, gelegt. Nach Einstich der Kanüle in die Pfortader, in die die Perfusionslösungen eingeleitet werden, wird die Ligatur festgezogen und mit einer Gefäßklemme fixiert. Die untere Hohlvene wird durchtrennt, um das Abfließen des Perfusats aus der Leber in den Bauchraum zu ermöglichen. Perfusionspuffer 1 wird bis zum Entbluten der Leber mit einer Durchflussrate von 5 ml/min eingeleitet. Anschließend wird noch weitere 10 min mit einer Durchflussrate von 40 ml/min gespült, wobei kurz vor Ende des Zeitintervalls der Brustkorb des Versuchstieres geöffnet und eine lose Ligatur um die Vena cava superior unterhalb des rechten Atriums gelegt wird. Durch Verschließen der Vena cava inferior erfolgt der Austrag nun über die Vena cava superior. Durch Einführen einer Venenverweilkanüle (G14), die ebenfalls durch die nun zugezogene Ligatur und eine Gefäßklemme fixiert wird, in das Atrium kann das Perfusat recycelt werden. Nachfolgend wird in die entblutete Leber Perfusionslösung 2 mit Kollagenase (50 mg; entspricht 20000 u) mit einer Durchflussrate von 20 ml/min für ca. 10 min eingeleitet. Die Kollagenase bewirkt die Auflösung der extrazellulären Matrix und damit die Dissoziation des Leberparenchyms in Einzelzellen. Sobald die Leber eine netzartige Struktur aufweist, wird die Perfusion beendet und die weiche Leber vorsichtig herausgetrennt und auf ein steriles, über ein Becherglas gespanntes Seidentuch gegeben. Unter sterilen Bedingungen werden die Leberzellen durch Öffnen der Gewebekapsel und anschließendes leichtes Reiben mit einer sterilen Pinzette unter Zugabe von etwa 200 ml Waschpuffer durch das Seidentuch filtriert. Zur Abtrennung der toten Zellen werden die so gewonnenen Primärhepatozyten auf 4 x 50 ml sterile Falcons verteilt und dann 2-3 min bei 50 g und Raumtemperatur zentrifugiert. Die überstehende Waschlösung wird vorsichtig abgesaugt, das Zellpellet mit je ca. 50 ml Waschlösung vorsichtig resuspendiert, und es erfolgt eine erneute Zentrifugation bei gleichen Bedingungen. Der überstehende Waschpuffer wird abgesaugt, und die sedimentierten Zellen werden unter Zugabe von etwa je ca. 5-10 ml Waschpuffer re-

suspendiert. Die so gewonnenen Zellsuspensionen werden in einem sterilen 50 ml Falcon-Röhrchen vereinigt.

2.2.2.2 Zellzahlbestimmung

Zur Bestimmung der Zellzahl und Vitalität wird eine Fuchs-Rosenthal-Zählkammer verwendet. Die Kammer weist 2 Zählfelder mit je 4 x 16 eingravierten Quadraten auf, die je eine Fläche von je 0,0625 mm² und eine Tiefe von je 0,2 mm besitzen. Dies ergibt ein Volumen von 0,0125 ml pro kleinstem Quadrat. Die Kammer wird einer 1 : 100 Verdünnung der Zellsuspension bestückt (990 µl Waschpuffer + 10 µl Zellsuspension). Hierbei ist besonders darauf zu achten, dass die Zellsuspension vor der Entnahme vollständig resuspendiert ist, da es sonst zu Fehlbestimmungen kommt. Unter dem Mikroskop werden 2 Felder mit jeweils 16 Quadraten ausgezählt und die Zellzahl wie folgt berechnet:

$$\text{Zellzahl pro ml} = \frac{\text{GZ} \cdot 80 \cdot 1000 \cdot V}{Q}$$

GZ = Gesamtzahl der ausgezählten Zellen

80 = Kammerfaktor

1000 = Einheitenfaktor

V = Verdünnungsfaktor (hier: 100)

Q = Anzahl der ausgezählten Kleinstquadrate (hier: 32)

Die Zahl der lebenden Zellen lag in der Regel zwischen 10 und 25 Millionen pro Milliliter.

2.2.2.3 Vitalitätsbestimmung

Die Bestimmung der Vitalität erfolgt nach dem Trypanblau-Ausschlusstest. Tote Zellen erscheinen blau, da in diese der Farbstoff eindringen kann. Die Kammer wird mit einer Lösung aus 150 µl Trypanblau, 150 µl Waschpuffer und 10 µl Zellsuspension befüllt. Das Verhältnis von ungefärbten und damit lebenden Zellen zur Gesamtzahl gibt Auskunft über die Zellvitalität der Präparation. Der Vitalitätsfaktor in Prozent berechnet sich aus dem Verhältnis der Anzahl der lebenden Zellen zur Gesamtzahl. Für die Versuche wurden ausschließlich Zellsuspensionen mit mindestens 85% Vitalität herangezogen.

2.2.2.4 Kultivierung

Die Zellen werden abhängig von dem nachfolgenden Versuchsverlauf wie folgt kultiviert.

Tabelle 2.7: Zellkulturbedingungen für primäre Rattenhepatozyten

| Plattentyp | Zellzahl | H4IIE-Medium | Medienwechsel nach |
|-------------------|-----------------|---------------------|-------------------------------|
| 24 Well | 200000/Well | 1 ml/Well | 2-3 h |
| 48 Well | 100000/Well | 500 µl/Well | 2 h |
| 96 Well | 40000/Well | 200 µl/Well | 2 h |
| 35 mm | 1 Mio/Platte | 2 ml/Platte | 2 h |
| 60 mm | 2,5 Mio/Platte | 4 ml/Platte | 3 h |
| 90 mm | 6 Mio/Platte | 7 ml/Platte | 3 h |

Die benötigte Gesamtmenge an Medium und Zellsuspension für den notwendigen Versuchsansatz wird zusammenpipettiert und unter ständigem Schwenken auf die Kulturschalen gleichmäßig verteilt. Die Primärhepatozyten werden generell im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

2.2.3 Zellbehandlung

2.2.3.1 Allgemein

Die Zellbehandlung erfolgt bei allen Zellarten - wenn nicht separat angegeben - nach dem ersten Medienwechsel nach der Aussaat der Zellen. Die mit Zelllinien kultivierten Platten sind zu diesem Zeitpunkt halbkonfluent, um nach der Inkubationszeit möglichst konfluente Schalen zu erhalten.

Alle verwendeten Substanzen sind in DMSO gelöst, wobei die Konzentration des DMSO im Medium konstant bei 0,5% des Gesamtvolumens gehalten wird, um zytotoxische Effekte und unterschiedliche Verteilung der Substanzen im Medium auszuschließen. Die Applikationslösungen werden somit in 200fach höherer Konzentration hergestellt. Da einige der untersuch-

ten Substanzen lichtempfindlich sind, erfolgt das Ansetzen und die Lagerung unter Lichtausschluss. Die Inkubationszeit beträgt 48 h. Jeder Versuchsansatz beinhaltet entsprechend der nachfolgend durchgeführten Analysen eine Positiv- und Negativkontrolle unter gleichen Bedingungen. Als Negativkontrollen dienen im allgemeinen unbehandelte Zellen und das verwendete Lösungsmittel. Als Positivkontrolle dient –außer für Zytotoxizitätsuntersuchungen– TCDD in einer Konzentration von 1 nM.

Tabelle 2.8: Inkubationsansätze und zugehörige Methoden

| Plattentyp | Medienvolumen | Volumen der Applikationslösung | Methoden |
|------------|---------------|--------------------------------|--|
| 48 Well | 0,5 ml | 2,5 µl | EROD-Assay |
| 35 mm | 2 ml | 10 µl | EROD-Assay |
| 60 mm | 2,5 ml | 12,5 µl | EROD-Assay, RNA-Isolierung, Transfektion, Kernextraktgewinnung, Mikrosomenherstellung, Zytotoxizitätstest, Proteinisolierung |
| 90 mm | 5 ml | 25 µl | RNA-Isolierung, Kernextraktgewinnung, Proteinisolierung, Mikrosomenherstellung |

2.2.3.2 Inkubation mit mehreren Substanzen

Zur Untersuchung des inhibitorischen Einflusses einer Substanz auf die Enzymaktivität erfolgt eine Koinkubation mit TCDD in einer Endkonzentration von 10^{-9} M auf 60 mm-Platten. Hierbei werden 1,25 μ l einer 10fach höher konzentrierten TCDD-Applikationslösung und 12,5 μ l der Lösung der Testsubstanz zupipettiert. Bei den entsprechenden Positiv- und Lösungsmittelkontrollen wird analog verfahren.

2.2.4 Zellernte

2.2.4.1 EROD-Assay

2.2.4.1.1 Nach Seglen

Nach der Inkubation wird das Medium entfernt, der verbleibende Zellrasen 3x mit 0,9%iger NaCl-Lösung gewaschen und pro 60 mm-Platte 1 ml eiskalter Tris/Sucrose-Puffer zugegeben. Der Zellrasen wird abgeschabt und in ein eisgekühltes Eppendorf-Cup überführt. Nach Zentrifugation bei 4°C und 2000 g für 10 min wird der Überstand entfernt und das Pellet in 400 μ l Tris/Sucrose-Puffer aufgenommen. Die Homogenisierung erfolgt an der Ultraschallsonde für 10 s. Die Homogenate werden bei –20°C gelagert.

2.2.4.1.2 Nach Kennedy

Die Well-Platte wird 3x mit 0,9%iger NaCl-Lösung gespült, getrocknet und bei –80°C über Nacht eingefroren. Danach erfolgt das Cracken der Zellen durch dreimaliges Wiederauftauen/Einfrieren. Die Platte wird für jeweils 15 min bei Raumtemperatur belassen und nachfolgend bei –80°C für 3 h gehalten. Danach werden die Platten bei –80°C gelagert.

Homogenate von Petrischalen werden analog der Methode nach Seglen hergestellt, wobei die Aufnahme des Pellets und die Homogenisierung für 60 mm-Platten in 250 μ l NaP-Puffer erfolgte, da Tris/Sucrose die nachfolgende Reaktion stört.

2.2.4.2 Mikrosomengewinnung

Alle Lösungen und Materialien sind eisgekühlt. Die Mengenangabe gelten für 90 mm-Schalen.

Das Medium wird von dem Zellrasen entfernt und dieser mit 3x 0,9%iger NaCl-Lösung gespült. 1 ml eiskalter Tris/Sucrose-Puffer wird zupipettiert, der Zellrasen abgeschabt, in ein

Eppendorf-Cup überführt und bei 4°C und 2000 g für 10 min zentrifugiert. Das verbleibende Pellet wird in 800 µl Tris/Sucrose-Puffer resuspendiert und mittels Ultraschall für 10 s homogenisiert. Nach Zentrifugation bei 4°C und 9000 g für 10 min wird der Überstand in UZ-Eppendorf-Cups überführt, und es erfolgt eine Zentrifugation bei 4°C und 100.000 g für 30 min. Der Überstand wird entfernt und die Pellets in 100 µl Tris/Sucrose-Puffer aufgenommen. Nach Homogenisierung durch Ultraschallpulse für 1-2 s werden die Lösungen bei -80°C gelagert.

Die Isolierung für Mikrosomen zur Verwendung im EROD-Assay nach Kennedy erfolgt analog, wobei das Pellet in 100 µl NaP-Puffer resuspendiert wird.

2.2.4.3 RNA-Isolierung

Die Durchführung erfolgt unter Eiskühlung aller verwendeten Materialien und Lösungen.

Die angegebenen Mengen entsprechen einer 60 mm-Platte.

Das Medium wird nach der Inkubationszeit abgegossen und die Zellen 3x mit 0,9%iger NaCl-Lösung gewaschen. Die Platten werden auf Eis gestellt, mit je 500 µl Lysis-Puffer versetzt und mit einem sterilen Zellschaber abgelöst. Nach Überführung in ein Eppendorf-Cup wird bei 4°C und 1000 g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wird in ein neues Eppendorf-Cup überführt, und je 500 µl Phenol werden zugegeben. Nach heftigem Durchmischen erfolgt eine Zentrifugation bei 10000 g und 4°C für 30 min. Der Überstand wird in ein neues Eppendorf-Cup, in dem wiederum 500 µl Phenol vorgelegt sind. Die Zentrifugation wird bei 4°C und 10000 g für 10 min durchgeführt. Die nachfolgenden Extraktionsschritte erfolgen analog mit je 500 µl Phenol : Chloroform (1 : 1) und dann 500 µl Chloroform. Nach der letzten Extraktion wird der Überstand mit je 50 µl Na-Acetat-Lösung (3 M; pH 5,4) angesäuert und mit 1 ml Ethanol versetzt. Die RNA wird bei -20°C über Nacht gefällt.

Nachfolgend wird bei 4°C und 10000 g für 30 min zentrifugiert, das Pellet mit je 250 µl 70%iger Ethanol-Lösung in DEPC-Wasser (0,1% in H₂O bidest; 24 h rühren, autoklavieren) gewaschen und bei 4°C und 10000 g für 10 min zentrifugiert. Das Pellet wird mit einem sterilen Wattestäbchen maximal für 5 min getrocknet und in 20-50 µl DEPC-Wasser resuspendiert. Die Lagerung erfolgt bei -80°C.

Die Quantifizierung erfolgt durch die photometrische simultane Bestimmung der Extinktion bei 260 und 280 nm. Die Konzentration wird wie folgt berechnet:

$$\text{RNA-Konzentration } [\mu\text{g/ml}] = E_{260} \cdot VF \cdot 40 \quad VF = \text{Verdünnungsfaktor}$$

Der Quotient E_{260}/E_{280} ist ein Maß für die Reinheit der RNA und sollte 1,8 nicht unterschreiten. Die Bestimmung erfolgt am Spektrophotometer oder mittels NanoDrop.

2.2.4.4 LDH-Assay

Die Durchführung erfolgt unter Eiskühlung aller verwendeten Materialien und Lösungen.

Die angegebenen Mengen entsprechen einer 60 mm-Platte.

1 ml des Medienüberstandes wird nach der Inkubationszeit in ein Eppendorf-Cup überführt und bei -80°C gelagert. Das restliche Medium wird entfernt, der Zellrasen 3x mit PBS gespült, und nach Zugabe von 800 μl PBS werden die Zellen abgeschabt. Die Zellsuspension wird bei 4°C und 2000 g für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wird abgossen und das Pellet für 5 s in je 400 μl PBS mittels Ultraschallsonde homogenisiert. Nach anschließender Zentrifugation bei 4°C und 9000 g für 10 min wird der Überstand in ein neues Eppendorf-Cup überführt und bei -80°C gelagert.

2.2.5 Bestimmung der 7-Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD)-Aktivität

2.2.5.1 Prinzip der Reaktion

Die Bestimmung der EROD-Aktivität dient als Maß für die CYP1A-Induktion. Die grundlegende Reaktion besteht aus der Umwandlung von 7-Ethoxyresorufin zu Resorufin über eine CYP1A-katalysierte oxidative Desalkylierung.

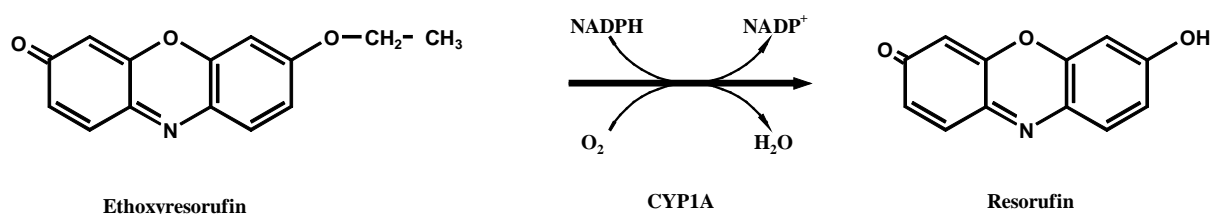


Abbildung 2.1: Oxidative Dealkylierung von Ethoxyresorufin zu Resorufin

Durch Generierung eines kontinuierlich regenerierenden Redoxsystems ist die gebildete Resorufinmenge der Menge an CYP1A proportional. Die Bestimmung erfolgt fluorimetrisch.

2.2.5.2 Modifizierte Methode nach Seglen

2.2.5.2.1 Durchführung für Gesamthomogenat

Die grundlegende Methode wurde von Burke und Mayer entwickelt (Burke und Mayer, 1974). Das hier angewandte Verfahren beruht jedoch auf den Modifikationen von Pohl und Fouts (Pohl und Fouts, 1980). Die Reduktionsäquivalente werden hier durch IDH/Isocitrat-System geliefert, welches die kontinuierliche Regeneration des gebildeten NADPH zu NADP⁺ gewährleistet.

Alle zu verwendenden Lösungen sind auf Eis vorzukühlen.

Der Ansatz pro Probe ist wie folgt zusammengesetzt:

200 µl EROD-Puffer

50 µl NADP⁺ (5mM)

10 µl IDH-Verdünnung

280 µl Homogenatverdünnung

Um Fehler zu minimieren wird ein Mix ohne Homogenat hergestellt, vorgelegt und die entsprechende Menge Homogenat zugegeben.

Die Ansätze werden für 10 Minuten bei 37°C im Wasserbad vorinkubiert. Anschließend erfolgt der Reaktionsstart durch Zugabe von 10 µl Ethoxyresorufin (75 µM in DMSO) in äquivalenten Zeitabständen. Nach 10 min wird die Reaktion in gleichen Intervallen durch Zugabe von 1 ml Methanol gestoppt. Das entstandene Proteinpräzipitat wird bei 4°C und 8000 g für 2 min abzentrifugiert. Die Proben werden lichtgeschützt transportiert und sofort vermessen.

Einstellungen des Fluoreszenzspektrometers:

| | |
|-----------------|----------------------|
| Exzitation (Ex) | 550 nm |
| Emission (Em) | 585 nm |
| Slit | 2,5 (Ex) bzw. 5 (Em) |
| Fix scale | 20 |
| Response | 3 |

Der Blindwert ohne Homogenat wird mittels der AutoZero-Funktion genullt. Die spezielle EROD-Aktivität wird nach Ermittlung einer Eichgerade und des Proteingehalts der Probe berechnet.

2.2.5.2.2 Durchführung für Mikrosomen

Das Verfahren wird prinzipiell analog der zuvor für Homogenat beschriebenen Methode durchgeführt. Die eingesetzte Menge an Mikrosomen wird über das berechnete Verhältniss von Gesamthomogenat zu Mikrosomen ermittelt. Nach Herstellung des Reaktionsansatzes werden pro Ansatz je 2,75 µl der Applikationslösungen der Testsubstanzen zugegeben und 10 min bei 37°C präinkubiert. Die nachfolgende Reaktion erfolgt wie beschrieben.

2.2.5.2.3 Proteinbestimmung nach Lowry

Zur Proteinbestimmung wird das Verfahren nach Lowry verwendet (Lowry et al., 1951). Pro Ansatz werden 100 µl Homogenatverdünnung, bestehend aus 5 bzw. 10 µl Homogenat und 95 bzw. 90 µl H₂O bidest, mit 100 µl 1N NaOH gemischt. Nach Zugabe von 1 ml frisch hergestellter Lowry A-Lösung werden die Ansätze gut geschüttelt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Während dieses Zeitraums wird die Lowry B-Lösung hergestellt. Pro Probe werden 100 µl zugesetzt. Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei Raumtemperatur erfolgt die Messung der Proben am Photometer bei einer Extinktion von 720 nm gegen H₂O bidest. Als Nullwert über die AutoZero-Funktion wird ein Ansatz ohne Homogenat (100 µl H₂O bidest) verwendet. Die Proteinkonzentration wird anhand einer BSA-Eichkurve ermittelt.

2.2.5.3 Methode nach Kennedy

Die von Kennedy et al. entwickelte Methode ermöglicht die simultane Bestimmung der EROD-Aktivität und des Proteingehalts im Well-Format an einem Fluoreszenz-Plattenreader (Kennedy und Jones, 1994; Kennedy et al., 1995). Mit einigen Modifikationen ist diese schnelle und effektive Methode auch zur Untersuchung von Substanzen an Primärhepatozyten und H4IIE-Zellen geeignet (Hausvorschrift; Schneiders, 2001).

2.2.5.3.1 Durchführung für 48 Well-Platten

Die bei -80°C gelagerten 48 Well-Platten werden aufgetaut und gegebenenfalls bis zur Verwendung im Kühlschrank gehalten. NADPH-Lösung (13 mM in NaP-Puffer; Lagerung bei -20°C) und ER-Stammlösung (1,05 mM ER in Methanol; Lagerung bei -20°C) werden aufgetaut und bis zur Verwendung auf Eis gelagert. Der NaP-Puffer wird auf Raumtemperatur temperiert. Die benötigte Menge an Fluorescaminlösung wird durch 1:1-Verdünnung der Stammlösung mit Acetonitril hergestellt und lichtgeschützt ebenfalls auf Raumtemperatur gebracht. Die ER-Stammlösung wird um das 3,9fache mit NaP-Puffer verdünnt und lichtgeschützt auf Eis gelagert.

Benötigte Menge an Reagenzien pro 48 Well-Platte:

NaP-Puffer 10 ml

Fluorescaminlösung 8 ml

NADPH-Lösung 1,3 ml

ER-Lösung 3,51 ml (90 μl ER-Stammlösung + 2,61 ml NaP-Puffer)

125 μl NaP-Puffer und 50 μl ER-Lösung werden pro Well dispensiert. Nach einer Inkubationszeit von 10 min bei 37°C wird die Reaktion durch Zugabe von 25 μl NADPH-Lösung gestartet. Nach 7 min erfolgt der Stop mittels 150 μl Fluorescaminlösung. Die fluorimetrische Messung wird nacheinander zunächst für Resorufin bei Ex 544 nm/Em 590 nm und danach zur Proteinbestimmung bei Ex 390 nm/Em 460 nm durchgeführt.

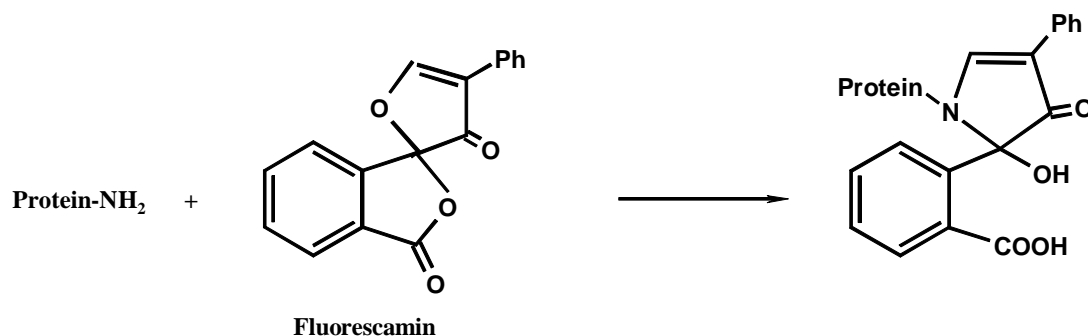


Abbildung 2.2: Reaktion von Fluorescamin mit Protein

Die Blankwerte enthalten keine NADPH-Lösung und zeigen somit nur die durch die Reaktionsbedingungen ausgelösten und CYP1A unabhängigen Zerfälle von Ethoxyresorufin an. Die Ermittlung der Resorufin- und Proteingehalte erfolgt über Standard-Eichkurven mit Resorufin und BSA.

2.2.5.3.2 Durchführung für Homogenat- und Mikrosomenproben

Die Homogenate werden aufgetaut und auf Eis gehalten. Für ein Well einer 96 Well-Platte lautet der Ansatz wie folgt:

| | |
|---------------------|-------|
| Homogenatverdünnung | 70 µl |
| ER-Lösung | 30 µl |
| NADPH-Lösung | 15 µl |
| Fluorescaminlösung | 90 µl |

Die Homogenatverdünnung besteht aus 7-10 µl Homogenat ad 70 µl NaP-Puffer. Die Durchführung erfolgt wie für 48 Well-Platten beschrieben.

Mikrosomen werden entsprechend dem zuvor bestimmten Verhältnis zum Gesamthomogenat eingesetzt. Ansatz und Durchführung sind analog, wobei vor Start der Reaktion eine 10minütige Präinkubation im Dunkeln bei 37°C mit den zu untersuchenden Substanzen erfolgt. Hierzu werden je 0,575 µl der Applikationslösungen pro 96 Well zugegeben.

2.2.5.4 Methode nach Donato

Die von Donato entwickelte Methode wird in Unterschied zu den anderen angewendeten Varianten der EROD-Messung an lebenden Zellen durchgeführt (Donato et al., 1993), eignet sich allerdings auch zur Bestimmung der EROD-Aktivität im Well-Format. Hier wird eine modifizierte Variante angewendet.

ER/D-Lösung (2 mM ER in DMSO; Lagerung bei -20°C) und steriler DC-Lösung (2 mM Dicumarol in 1N NaOH; Lagerung bei -20°C) werden aufgetaut. Pro 48 Well Platte werden 25 ml ERDC-Medium hergestellt. Das Medium wird abgesaugt und pro Well werden 500 μl des ERDC-Medium zupipettiert. Die Inkubationszeit beträgt 90 min im Brutschrank bei 37°C . Die Bestimmung des Resorufingehalts erfolgt sofort im Plattenreader bei Ex 544 nm/Em 590 nm.

Nach der Messung wird die Platte 3x mit NaCl (0,9%) gespült, gut getrocknet und bei -80°C gelagert. Nach dem Cracken der Zellen durch 3maliges wiederholtes Auftauen und anschließendes Wiedereinfrieren der Platte bei -80°C für ca. 3 h kann die Proteinbestimmung erfolgen.

Proteinbestimmung

Alle verwendeten Lösungen werden auf Raumtemperatur temperiert. Die 48 Well-Platte wird aufgetaut und pro Well mit 200 μl NaP-Puffer und 150 μl Fluorescaminlösung versetzt. Die Messung erfolgt bei Ex 544 nm/Em 590 nm.

2.2.6 Zytotoxizitätstests

2.2.6.1 LDH-Assay

Extrazelluläre Laktatdehydrogenase (LDH) ist ein bekannter Marker für den Zelltod, da die mit dem Absterben der Zelle verbundene Zelllyse einen Verlust der Membranintegrität hervorruft, was die Freisetzung ansonsten intrazellulärer Enzyme zu Folge hat.

Der LDH-Gehalt wird in Medium und Homogenat der zu untersuchenden Probe über die zeitabhängige Fluoreszenzabnahme von NADH bestimmt. Hierbei wird NADH als Äquivalent

der LDH-vermittelten Reduktion von Pyruvat zu Laktat oxidiert. (Bergmeyer und Bernt, 1963)

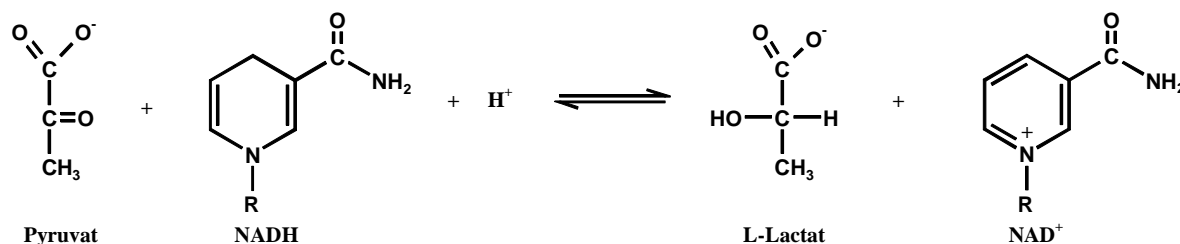


Abbildung 2.3: Oxidation von Pyruvat zu Laktat durch LDH

Die Durchführung des Assays erfolgte nach einer modifizierten Methode von Moran und Schnellmann im 96 Well-Format (Moran und Schnellmann, 1996; Ulrichova et al., 2001). Der Ansatz pro Well lautet wie hier angegeben:

| | |
|-----------------------|-----------|
| Medium bzw. Homogenat | 0-60 µl |
| Pyruvat-Lösung | 20 µl |
| LDH-P-Puffer | ad 180 µl |
| NADH-Lösung | 20 µl |

Das Medium bzw. Homogenat wird vorgelegt. Nach Zugabe des frisch hergestellten LDH-wird die Platte geschüttelt und die Reaktion mittels NADH-Lösung gestartet. Die kinetische Messung erfolgt bei Ex 360 nm/Em 460 nm für 2,5 min alle 15 s.

2.2.6.2 MTT-Test

Der MTT-Test ist ein Maß für die Aktivität mitochondrialer Reduktasen lebender Zellen. Hierbei spielt ihre Funktion bei der in der Inkubationszeit durchgeführten DNA-Synthese keine Rolle. MTT wird nach Eindringen in die Zelle durch Dehydrogenasen aktiver Mitochondrien über eine reduktiven Ringspaltung zu Formazan umgewandelt. Die Intensität des blauen Reaktionsprodukts lässt sich photometrisch bestimmen. (Freshney, 1994; Liu et al., 1997; Lindl und Bauer, 1994)

Das Medium wird 24 h nach der Inkubation unter sterilen Bedingungen entfernt, die Zellen werden 3x mit sterilen PBS gewaschen und mit je 2 ml Medium und je 200 µl MTT-Lösung (5 mg/ml in Medium) pro Platte versetzt. Nach einer Inkubation von 2 h bei 37°C im Brutschrank wird das Medium abgesaugt, der Zellrasen 3x mit PBS gewaschen und je 800 µl saure Isopropanol-Lösung (0,05 N HCl in Isopropanol) zugegeben. Die lysierten Zellen werden abgeschabt und in ein Eppendorf-Cup überführt. Nach Homogenisierung durch Ultraschall für 5 s erfolgt eine Zentrifugation bei 7000 g für 10 min. Der Überstand wird in ein weiteres Eppendorf-Cup pipettiert. Nach geeigneter Verdünnung mit saurer Isopropanol-Lösung erfolgt die Messung am Plattenreader bei 570 nm. Als Referenzwert dient die reine saure Isopropanol-Lösung.

2.2.7 Transfektion von H4IIE-Zellen mit einem Reportergenplasmid

2.2.7.1 Herstellung Kalziumchlorid-kompetenter Bakterien

Zur Gewinnung Kalziumchlorid-kompetenter Bakterien werden XL 10 Gold-Zellen verwendet (Stratagene). 145 µl der Zellsuspension werden in 5 ml 2YT-Medium bei 37°C und ca. 160 rpm im Bakterienschüttler über Nacht inkubiert. Danach wird 1 ml dieser Vorkultur in 500 ml frisches 2YT-Medium überimpft und unter den selben Bedingungen inkubiert, bis eine Extinktion bei 600 nm von ca. 0,5 erreicht ist. Es erfolgt eine Zentrifugation bei 4°C und 1200 g für 5 min. Der Überstand wird abdekantiert, das Pellet in einigen Milliliter kalter 0,1 M CaCl₂-Lösung resuspendiert, und es wird mit 0,1 M CaCl₂-Lösung auf 50 ml aufgefüllt. Die gemischte Lösung wird 20 min auf Eis inkubiert und - wie oben beschrieben – zentrifugiert. Nach Entfernen des Überstandes werden 5 ml kalte 0,1 M CaCl₂-Lösung und 6 ml 40%iges Glycerin zugefügt, das Pellet vorsichtig resuspendiert und Aliquote hergestellt. Die Lagerung erfolgt bei -80°C.

2.2.7.2 Transformation eines Reportergenplasmids in kompetente Bakterien

10 ng der Plasmid-DNA werden mit 100 µl kompetenter Zellen und 900 µl kalter 0,1 M CaCl₂-Lösung versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Der Ansatz wird für 1 min bei 42°C hitzegeschockt und dann 2-3 min auf Eis stehen gelassen. Es erfolgt eine Zentrifugation für 1 min bei 3200 g. Der Überstand wird verworfen und das Pellet in 300 µl 2YT-Medium auf Eis resuspendiert. Nach Inkubation für 10 min bei 37°C und 250 rpm im Bakterienschüttler werden die Zellen mit einem ausgeglühten Drygalski-Spatel auf Ampicillin-haltige LB-Agarplatten ausgestrichen. Die Platten inkubieren über Nacht bei 37°C im Brutschrank. Es

wachsen hierbei nur Kolonien auf der Schale, die das Antibiotikaresistenz-vermittelnde Plasmid enthalten.

2.2.7.3 Gewinnung der Plasmide

Eine plasmidhaltige Kolonie wird mit einer sterilen Pipettenspitze gepickt und in 5 ml Ampicillin-haltiges (100 µg/ml) LB- oder 2YT-Medium überführt. Nach Inkubation im Bakterien-schüttler bei 37°C und 200 rpm über Nacht werden 2 ml der Vorkultur in 500 ml Ampicillin-haltigem LB-Medium überführt und für 24-48 h bei 37°C und 150-200 rpm im Schikanekolben geschüttelt. Nach der Inkubationszeit erfolgt die Plasmidisolierung entweder mit einer Plasmid-Miniprep oder Plasmid-Maxiprep. Hierbei werden der QIAprep Spin Miniprep Kit, der QIAfilter Plasmid Maxi Kit (Qiagen, Hilden) und der Gen EluteTM Endotoxin-free Plasmid Maxiprep Kit (Sigma, Deisenhofen) verwendet. Bei der Herstellung wird nach den Vorgaben des Herstellers vorgegangen.

Zur Lagerung plasmidhaltiger Bakterien werden Glyzerinstocks aus der Vorkultur hergestellt. Dabei werden 225 µl Glyzerin und 1 ml der Vorkultur gut gemischt und bei -80 °C gelagert.

Die Quantifizierung der Plasmid-DNA erfolgt durch simultane Extinktionsmessung bei 260 und 280 nm.

2.2.7.4 Durchführung der Transfektion

Die Transfektion erfolgte mittels der Kalziumphosphat-Kopräzipitationsmethode in Anlehnung an eine Vorschrift der Firma Promega (Doyle, 1996) unter sterilen Bedingungen.

Einen Tag vor der Transfektion wurden konfluente 90 mm Platten wie beschrieben trypsiniert und die H4IIE-Zellen auf 60 mm Platten in 4 ml Kulturmedium mit einer Verteilungsrate von 1:10 gleichmäßig ausgesät (ca. 40000 Zellen/cm²). Pro Probe und Kontrolle erfolgt die Bestimmung im Triplikat. Für einen Transfektionsansatz werden jeweils gleiche Volumina an 2x HBS-Puffer und Plasmidmix in separaten sterilen 50 ml-Röhrchen vorgelegt. Die Reporter-gen-Plasmid-Lösung wird für den gesamten Versuchsansatz aus den zuvor gewonnenen Plasmidlösungen hergestellt, um eventuelle qualitative Unterschiede der einzelnen Präparationen auszuschließen.

Der Plasmidmix setzt sich für eine Platte wie folgt zusammen:

2 M CaCl₂-Lösung (autoklaviert) 37 µl

| | |
|---|-----------|
| Reportergen-Plasmid-Lösung | 10 µg |
| Kontrollplasmid pRL-SV40 | 1 µg |
| H ₂ O bidest. (autoklaviert) | ad 300 µl |

Der Plasmidmix wird langsam und tropfenweise in den ständig gevortexten 2x HBS-Puffer pipettiert. Während der Inkubationszeit von 30 min bei Raumtemperatur bildet sich ein feinverteiltes Kalziumphosphat-DNA-Kopräzipitat. Danach werden 600 µl dieser Lösung tropfenweise auf eine Platte verteilt und diese für 4 h im Brutschrank inkubiert. Anschließend erfolgt ein Medienwechsel mit je 2,5 ml Medium pro Platte. Zu diesem Zeitpunkt werden die Zellen mit den zu untersuchenden Substanzen behandelt und nach 48 h Inkubationszeit geerntet.

Die Kotransfektion des Reportergenkonstrukt mit dem pRL-SV40-Plasmid (Promega) dient zur internen Kontrolle und Standardisierung der Transfektion. Während das Reportergenplasmid eine firefly (*Photinus pyralis*) Luciferase exprimiert, liegt bei dem Ampicillin-Resistenz vermittelnden Plasmid pRL-SV40 das Enzym renilla (*Renilla reniformis*) Luciferase konstitutiv unter Kontrolle eines SV40-Promotors vor. Aufgrund der schlechten Transfektionseigenschaften der verwendeten Zelllinie werden hier recht hohe Mengen an Plasmid verwendet um eine möglichst gleichmäßige und ausreichende Transfektionsrate zu gewährleisten.

2.2.8 Reportergen-Assay

Die Bestimmung der Luciferase-Aktivitäten erfolgte mittels Verwendung des 'Dual-Luciferase[®] Reporter Assay System' (Promega). Durch Zusatz von Luciferin - enthalten im Luciferase Reagent II - wird die firefly Luciferase in einer ATP, Mg²⁺ und O₂ abhängigen Reaktion unter Lichtemission oxidiert. Nach der Messung dieser Lichtemission wird die firefly Luciferase-abhängige Reaktion durch Zugabe des Stop&Glo[®] Reagenz blockiert und gleichzeitig die Renilla Luciferase aktiviert. Hierbei wird Coelenterazin unter Lichtemission oxidiert.

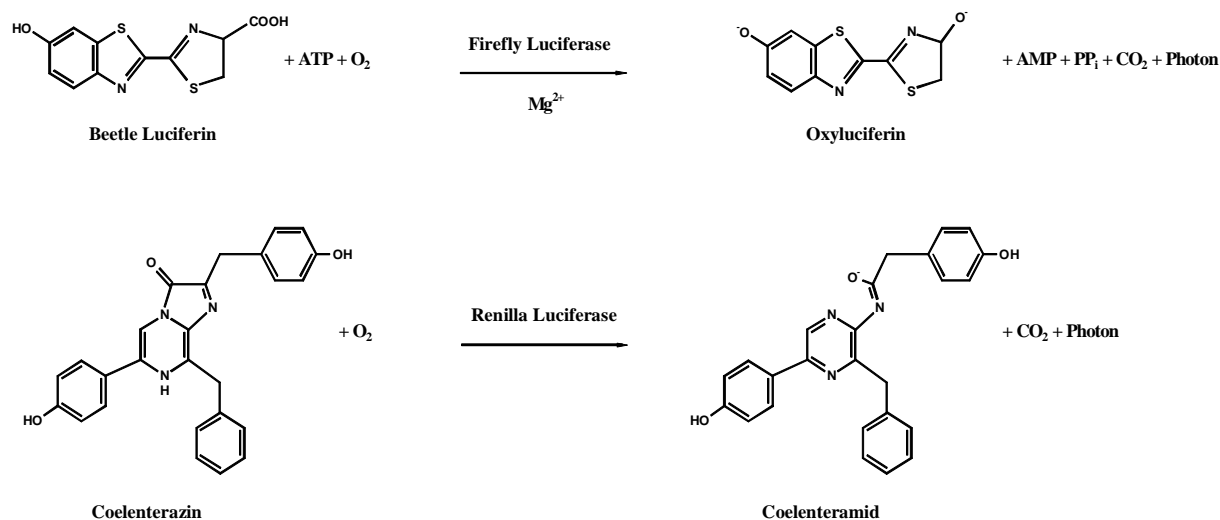


Abbildung 2.4: Reaktionen der Luciferasen (nach Technical's Manual 'Dual Luciferase[®] Reporter Assay System', Promega)

Nach der Inkubationszeit wird das Medium entfernt und die Zellen 3x mit kaltem 1x PBS-Puffer (TF) gewaschen. Die Zellen werden durch Zugabe von 400 µl 1x Passive Lysis Buffer (Promega) pro Platte lysiert und mit Einmal-Zellschabern von der Platte abgenommen. Die Zentrifugation der Lysate erfolgt bei 10000 g für 1 min bei Raumtemperatur.

Je 20 µl der überstehenden Lösung werden in 5 ml Luminometerröhrchen (Sarstedt) vorgelegt. Die Lichtemission (Reportergen-Aktivität) wird durch Zugabe von je 100 µl Luciferase Reagent II gestartet und die Proben umgehend mit einer Messzeit von 10 s gemessen. Anschließend werden 100 µl Stop&Glo[®] Reagenz zupipettiert und die Lichtemission in gleicher Weise umgehend gemessen (Kontrollgen-Aktivität).

2.2.9 Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

Der 'Electrophoretic Mobility Shift Assay' (EMSA) dient zur Untersuchung von Nukleinsäure-Protein-Interaktionen. Die Bindung von z.B. DNA-Fragmenten an Proteine führt im Allgemeinen zu einer reduzierten elektrophoretischen Mobilität des Fragmentkomplexes in einem nicht denaturierenden Gel.

2.2.9.1 Kernextraktgewinnung

Die inkubierten und konfluenten 60 mm Schalen werden nach Entfernen des Mediums 3x mit eiskalter 0,9%iger NaCl-Lösung gewaschen und anschließend nach Zugabe von je 1 ml 10 mM HEPES inkl. 1 mM DTT und PMSF 15 min auf Eis inkubiert. Nachfolgend werden die Zellen mit einem sterilen Zellschaber abgenommen und in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Die Zentrifugation erfolgt bei 4°C für 5 min bei 500 g. Nach Abgießen des Überstandes wird das Pellet in 250 µl MDH-Puffer aufgenommen und in ein Eppendorf-Cup überführt. Die Homogenisierung wird auf Eis mittels eines Mikrohomogenisators (Roth) mit ca. 15 Hüben durchgeführt. Danach wird 2-3 min und 4 °C bei 1000 g zentrifugiert und der Überstand in ein UZ-Eppendorf-Cup überführt, welches 10% seines Volumens an Glycerin enthält. Die Ultrazentrifugation erfolgt bei 4 °C für 60 min und 100.000 g. Der Überstand (zytosolische Fraktion) kann bei –80°C gelagert werden. Das Pellet wird in 175 µl Extraktionslösung (25 mM HEPES, pH 7,6; steril, Lagerung bei 4°C) aufgenommen, mit 50 µl 2 M KCl, 30 µl 80%iges Glycerin sowie 1 mM DTT versetzt und 45 min in Eis heftig geschüttelt. Nach einer weiteren Ultrazentrifugation bei 4 °C für 60 min bei 100.000 g wird der Überstand, der den Kernextrakt enthält, aliquotiert und bei –80°C gelagert.

Die Proteinbestimmung erfolgt mit dem BCA Protein Assay Kits (Pierce, Rockford, IL) analog der Beschreibung des Herstellers. Das Probenvolumen beträgt 5 bzw. 10 µl. Der Blankwert besteht aus Extraktionslösung. Die Messwellenlänge liegt bei 562 nm. Zur Standardisierung wird eine BSA-Lösung verwendet.

2.2.9.2 Oligonukleotid-Sonden

Die verwendeten Oligonukleotide enthalten mindestens eine zur Untersuchung benötigte XRE-Bindungsstelle.

Tabelle 2.9: Verwendete Primer und Bezeichnung

| Bezeichnung | Sequenz |
|---------------------|--|
| Rat XRE for | 5`-GATCTGGCTCTTCTCACGCAACTCCG-3` |
| Rat XRE rev | 5`-CGGAGTTGCGTGAGAAGAGCCAGATC-3` |
| maus XRE for | 5`-GATCTGAGCTCGGAGTTGCGTGAGAAGAGCCG-3` |

maus**XR**Erev

5`-GATCGGCTCTTCTCACGCAACTCCGAGCTCA-3`

2.2.9.2.1 Hybridisierung

Für die Hybridisierung wird die gleiche Menge (je 25 µg) der jeweils komplementären einzelsträngigen Oligonukleotide mit 10 µl 10x TNE-Puffer in einem Gesamtvolumen von 100 µl gemischt. Die Lösung wurde im Wasserbad für 2 min bei 80 °C inkubiert und danach ganz langsam im ausgeschalteten Wasserbad auf Raumtemperatur abgekühlt. Nach Zugabe von 10 µl 3 M Na-Acetat-Lösung, 0,5 µl 1,5 M Magnesiumchlorid-Lösung und 200 µl kaltes absolutes Ethanol wird die Lösung zur DNA-Fällung mindestens 30 min bei –80 °C gehalten. Durch Zentrifugation von 10 min bei 9000 g und 4 °C wird ein Pellet erhalten, das durch Zugabe von 500 µl 70% Ethanol und erneute Zentrifugation für 5 min gewaschen wird. Nach Entfernen des Überstandes wird das Pellet kurz luftgetrocknet, in 20 µl H₂O bidest aufgenommen und die Konzentration der DNA photometrisch bestimmt.

2.2.9.2.2 Radioaktive Markierung der Oligonukleotide

Die hybridisierten Oligonukleotide werden mittels der T4 Polynucleotide Kinase (T4 PNK, Promega) radioaktiv markiert. Der Reaktionsansatz setzt sich wie folgt zusammen:

| | |
|-------------------------------|------|
| Oligonukleotide (1 µM) | 4 µl |
| T4 PNK-Puffer (10x) | 1 µl |
| [$\gamma^{32}\text{P}$]-ATP | 1 µl |
| T4 PNK (5 U/µl) | 4 µl |

Nach dem Zusammenpipettieren des Ansatzes auf Eis wird eine Inkubation bei 37 °C für 40 min durchgeführt. Danach wird 1 µl 0,5 M EDTA (pH 8,0) hinzugefügt und mit TE-Puffer (pH 8,0) auf 50 µl aufgefüllt.

Die Aufreinigung der markierten Oligonukleotide erfolgte mit Hilfe der mini Quick SpinTM Columns (Roche) nach Vorgaben des Herstellers. Das Prinzip dieser Methode beruht auf einer Gelfiltrations-Chromatographie, welche die aufgetragenen Moleküle aufgrund ihrer relativen Größen trennt.

2.2.9.3 Durchführung des EMSA

Der grundlegende Ansatz zur Optimierung des EMSA lautet wie folgt:

Tabelle 2.10: Ansätze für EMSA (pro Probe)

| | Negativkontrolle | Testansatz | Hemmungsansatz |
|--------------------------------------|------------------|------------|----------------|
| 5x Inkubationspuffer | 4 µl | 4 µl | 4 µl |
| Kernextrakt | - | 25 µg | 25 µg |
| pdI-dC [40 ng/µl] | 0,5 µl | 0,5 µl | 0,5 µl |
| DTT [10 mM] | 1 µl | 1 µl | 1 µl |
| Unmarkiertes Oligo-nukleotid [10 µM] | - | - | 4 µl |
| H ₂ O bidest | ad 20 µl | ad 20 µl | ad 20 µl |

Die Versuchsdurchführung wurde sowohl in Reagentien, Probengewinnung als auch Inkubationszeiten optimiert. Im Nachfolgenden sind die Endbedingungen angegeben. Die Ansätze werden auf Eis pipettiert und 15 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 1 µl markiertem Oligonukleotid wird die Lösung für weitere 15 min bei RT belassen. Die Elektrophorese erfolgt nach Gelvorlauf für 45 min bei 4°C in 1x TGE und 100 V unter gleichen Bedingungen bei 170 V für 2 h. Anschließend wird das Gel bei 60°C im Vakuum getrocknet, in eine Filmkassette eingelegt und unter Rotlicht mit einem Film bedeckt. Die Exposition erfolgt bei – 80°C für 1-2 d. Die Entwicklung wird analog der RT-PCR durchgeführt.

2.2.10 Western Blot Analyse

2.2.10.1 Proteinisolierung

Alle verwendeten Lösungen und Gefäße sind steril und werden eisgekühlt.

Das Inkubationsmedium wird abgesaugt und der Zellrasen 3x mit 0,9%iger NaCl-Lösung gewaschen. Pro Platte werden 500 µl der NaCl-Lösung pipettiert, die Zellen abgeschabt und in ein Eppendorf-Cup überführt. Es erfolgt eine Zentrifugation bei 3000 g bei 4°C für 10 min. Nach Entfernen des Überstandes wird das Pellet in 400 µl Schwellpuffer resuspendiert und die Lösung mittels Ultraschallsonde für 3x 10 s homogenisiert. Die Lagerung des Gesamtproteins erfolgt bei –80°C.

2.2.10.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung des Proteingehalts wird mit dem BioRad DC Protein Assay (BioRad, München) durchgeführt analog der Anleitung des Herstellers. Das Verfahren beruht auf der von Bradford entwickelten Methode.

In einer 96 Well-Platte werden je 1 µl des Gesamthomogenats mit 19 µl H₂O bidest versetzt und gut gemischt, wobei die Messung der Proteinkonzentration im Triplikat erfolgt. Die benötigte Menge an BioRad Protein Dye Reagenz wird 1 : 5 verdünnt und je 200 µl pro Well werden zum Ansatz zupipettiert. Die Messung erfolgt in einem Mikroplattenreader bei 570 nm. Als Standard dient eine BSA-Lösung (0,5 mg/ml) in geeigneten Verdünnungen.

2.2.10.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)

Die SDS-Page dient zur Trennung von Proteinen im homogenen elektrischen Feld anhand ihrer Molekülgröße. Hierzu werden die zu untersuchenden Proteine zunächst mit dem anionischen Detergens SDS denaturiert, was dazu führt, dass die Wanderungsgeschwindigkeit bei der Elektrophorese ausschließlich der Molekülgröße proportional ist und nicht mehr von der Ladungsverteilung der Proteine abhängt.

Die Lösungen für das Trenngel werden zusammenpipettiert, wobei APS und TEMED zum Start der Polymerisation als letztes zugesetzt werden. Die Gelgießapparatur wird zu ca. Dreiviertel befüllt, und auf die Oberkante des Gel werden einige Tropfen n-Butanol gegeben, um einen planaren Gelrand zu erhalten. Nach der Polymerisation wird das n-Butanol mit Filterpapieren entfernt, die Gellösung des Sammelgels hergestellt und die Gießkammer vollständig

aufgefüllt. Ein Kamm wird eingeführt und das Gel polymerisiert für ca. 45 min bei Raumtemperatur, während die Probenaufbereitung erfolgt.

Eine einheitliche Menge an Protein wird mit H₂O bidest ad 15 µl eingestellt und diese mit 10 µl Lämmli-Puffer versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei Raumtemperatur erfolgt der Probenauftrag auf das zuvor mit Elektrophoresepuffer geflutete Gel. Für jedes Gel wird ein Molekulargewichtsstandard mitgeführt. Die Gelelektrophorese wird zunächst für 30 min bei 75 V und nachfolgend für 1,5-2 h bei 100 V durchgeführt.

2.2.10.4 Western Blotting

Die negativ geladenen Proteine werden im Semidry-Verfahren auf eine PVDF-Membran übertragen. Ein mit Anodenpuffer I getränktes Filterpapier in Gelgröße wird auf die anodische Graphitelektrode gelegt und mit zwei Filterpapieren bedeckt, die in Anodenpuffer II äquilibriert wurden. Die Membran, die zuvor für ca. 10 min in Methanol inkubiert und dann kurz in H₂O gespült wurde, wird darübergeschichtet. Das mit Kathodenpuffer getränkte Gel wird aufgelegt, sowie drei ebenfalls mit Kathodenpuffer äquilibrierte Filterpapiere. Der Transfer erfolgt bei konstanter Stromstärke von 50 mA pro Gel für 1-1,5 h.

2.2.10.5 Immunologische Detektion

2.2.10.5.1 Antikörperinkubation

Nach dem Blotting wird die Membran über Nacht bei 4°C in einer 5%igen Milchpulverlösung (in TBS-T) geschwenkt, um unspezifische Bindungsstellen für die nachfolgende Antikörperreaktion zu blockieren. Nach der Inkubationszeit wird die Blocking-Lösung entfernt, die Membran 3x für je 5 min mit TBS-T gewaschen und der erste CYP1A1-spezifische monoklonale Antikörper (1A3-03; Rubitec, Bochum) in einer 1 : 300 Verdünnung in TBS zugegeben. Die Inkubationsdauer beträgt 90 min bei Raumtemperatur. Nach erneuten Waschen wie oben beschrieben erfolgt die zweite Antikörperinkubation mit dem sekundären, mausspezifischen Antikörper. Dieser wird in einer Verdünnung von 1 : 5000 in TBS eingesetzt. Nach der Inkubation bei Raumtemperatur für 60 min wird die Membran wiederum 3x in TBS-T gewaschen. Die Detektion kann nun erfolgen.

2.2.10.5.2 Detektion mit dem Enhanced Chemiluminescence (ECL)-Verfahren

Das Prinzip dieser Technik beruht auf der Reaktion des in den Reagenzien enthaltenen Luminals durch die mit dem sekundären Antikörper konjugierten Meerrettich-Peroxidase, wobei das Oxidationsprodukt in einen angeregten Zustand vorliegt. Die Lichtemissionen bei Rückkehr in den Grundzustand können detektiert werden.

Hierzu wird die Transfermembran mit einem 1 : 1 Mix der Reagentien (Western Lighting, Perkin-Elmer) im Dunkeln benetzt und kurz inkubiert. Die überschüssigen Chemikalien werden entfernt und die Membran in Frischhaltefolie eingeschlagen. Die Detektion erfolgt über Aufnahme am Lumi-Imager oder Auflage eines Röntgenfilms für 30 min bei Raumtemperatur und nachfolgender Entwicklung wie in 2.2.11.2 beschrieben.

2.2.11 RT-PCR

2.2.11.1 Reverse Transkription

Die zu untersuchende RNA wird mit Hilfe eines poly-dT-Primers, der an den poly-A-Schwanz der mRNA anlagert, in cDNA umgeschrieben. Dabei werden 100 ng der Gesamt-RNA in folgendem Reaktionsgemisch revers transkribiert:

Tabelle 2.11: RT-Ansatz (pro Probe)

| RT-Puffer (5x) | dNTP-Mix (10 mM) | p(dT)₁₅ (10 µM) | RNAsin (39 u/µl) | AMV-RT (20 u/µl) | RNA (100 ng/µl) | PCR-H₂O ad 15 µl |
|--------------------------|----------------------------|--------------------------------------|----------------------------|----------------------------|---------------------------|---------------------------------------|
| 3 µl | 1,5 µl | 1,5 µl | 0,3 µl | 0,3 µl | 1 µl | 7,4 µl |

Das verwendete Temperaturprogramm durchläuft folgende Schritte:

Tabelle 2.12: RT-Programm

| | Primer-Anlagerung | Reverse Transkription | Enzymdenaturierung |
|-----------------|-------------------|-----------------------|--------------------|
| Temperatur [°C] | 23 | 42 | 95 |
| Zeit [min] | 10 | 60 | 5 |

2.2.11.2 PCR-Reaktion

Für die PCR-Reaktion werden folgende Primer verwendet (Accession Number: X 00469; Till, 1998):

Sense Primer: 5`-CCATGACCAGGAACTATGGG-3`

Antisense Primer: 5`-TCTGGTGAGCATCCAGGACA-3`

Hierbei wird ein 341 bp großes *CYP1A1*-Fragment amplifiziert.

Zur Kontrolle der Reaktion wird simultan ein GAPDH-Fragment mit einer Größe von 576 bp mit den nachfolgend aufgeführten Primern koamplifiziert (Fort et al., 1985).

Sense Primer: 5`-CCATCACCATCTTCCAGGAG-3`

Antisense Primer: 5`-CCTGCTTCACCACCTTCTTG-3`

Pro Ansatz werden 2,5 µl des aus der RT-Reaktion gewonnen cDNA verwendet.

Tabelle 2.13: PCR-Ansatz pro Probe

| PCR-Puffer (10x) | MgCl₂ (50 mM) | dNTP-Mix (10 mM) | For-Primer (10 µM) | Rev-Primer (10 µM) | For-GAPDH-Primer (10 µM) | Rev-GAPDH-Primer (10 µM) | Taq-Poly. (5 u/µl) | α-³²P-dCTP (37 kBq/µl) | PCR-H₂O ad 25 µl |
|----------------------------|------------------------------------|----------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------|---|---------------------------------------|
| 2,5 µl | 1,25 µl | 1,25 µl | 1 µl | 1 µl | 1 µl | 1 µl | 0,125 µl | 0,1 µl | 13,275 µl |

Tabelle 2.14: PCR-Temperaturprogramm

| | Template-Denaturierung | Primer-Anlagerung | Produktsynthese |
|-----------------|------------------------|-------------------|-----------------|
| Temperatur [°C] | 95 | 56 | 72 |
| Zyklus 1 | 5 min | 1 min | 1 min |
| Zyklus 2-36 | 1 min | 1 min | 1 min |
| Zyklus 37 | 1 min | 1 min | 5 min |

Gelelektrophorese

Nach Beendigung der PCR-Reaktion werden 15 µl des radioaktiv markierten Produkts mit 5 µl Gelbeladungspuffer versetzt und auf ein nicht-denaturierendes Polyacrylamid-Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgt bei 200 V für 2 h. Anschließend wird das Gel bei 60°C im Vakuum (Maxidry-Geltrockner) ca. 2 h getrocknet.

Autoradiographie

Das getrocknete Gel wird unter Rotlicht mit einem Autoradiographiefilm belegt und 1-2 d inkubiert. Der Film wird anschließend einige Minuten unter Rotlicht in Entwicklerlösung geschwenkt, bis die Banden gut zu erkennen sind. Nach Spülung mit H₂O wird der Film für 10 min in Fixierlösung inkubiert und darauffolgend nochmals mit H₂O gewaschen. Die Trocknung erfolgt an Luft für ca. 30 min.

2.2.12 Real time PCR

Bei der real time PCR werden die PCR-Produkte in der exponentiellen Phase der Reaktion über Fluoreszenzmessung detektiert. Der Fluoreszenzanstieg ist dabei proportional der Menge an Ausgangs-DNA und ermöglicht somit eine einfache direkte Quantifizierung der Produkte.

Durch Berechnung des Verhältnisses eines Kandidatengens zu einem Standardgen kann durch relative Quantifizierung u. a. eine Genexpressionsanalyse durchgeführt werden.

Zur reversen Transkription wird der iScript™ cDNA Synthesis Kit (BioRad, München) analog der Beschreibung des Herstellers verwendet. Pro Ansatz werden 100 ng der Gesamt-RNA eingesetzt.

Ansatz pro Probe:

| | |
|--------------------------------|-------|
| 5 x Reaction Mix | 4 µl |
| Reverse Transcriptase | 1 µl |
| RNA [100 ng/µl] | 1 µl |
| Nuclease Free Water (ad 20 µl) | 14 µl |

RT-Temperaturprogramm:

Tabelle 2.15: RT-Temperaturprogramm

| | Primer-Anlagerung | Reverse Transkription | Enzymdenaturierung |
|-----------------|-------------------|-----------------------|--------------------|
| Temperatur [°C] | 25 | 42 | 85 |
| Zeit [min] | 5 | 30 | 5 |

Die für die real time PCR-Reaktion verwendeten Primerpaare wurden so gewählt, dass mindestens ein Primer über einer Intronbrücke liegt, um eine Bindung an DNA-Verunreinigungen auszuschließen.

CYP11A1-Fragment: 117 bp (Accession Number: NM 012540)

Sense Primer: 5'-CCCACAGCACCATAAGAGATACAAGTC-3'

Antisense Primer: 5'-GGCCGGAACCTCGTTTGGATC-3'

GAPDH-Fragment: 87 bp (Accession Number: AF 106860)

Sense Primer: 5`-TGCACCACCAACTGCTTAGC-3`

Antisense Primer: 5`-GGCATGGACTGTGGTCATGAG-3`

Die Durchführung der real time PCR erfolgt mittels des IQTM SYBR Green Supermix (Bio-Rad, München) nach den Angaben des Herstellers. Der Reaktionsansatz wird hierbei auf das Gesamtreaktionsvolumen von 25 µl pro Probe reduziert.

| | |
|--------------------------------|----------|
| SYBR Green Supermix | 12,5 µl |
| Sense-Primer [10 µM] | 0,5 µl |
| Antisense-Primer [10 µM] | 0,5 µl |
| cDNA | 1,25 µl |
| Nuclease Free Water (ad 25 µl) | 10,25 µl |

Tabelle 2.16: PCR-Programm

| | Template-Denaturierung | Primer-Anlagerung | Produktsynthese |
|-----------------|------------------------|-------------------|-----------------|
| Temperatur [°C] | 95 | 59 | 72 |
| Zyklus 1 | 3 min | - | - |
| Zyklus 2-41 | 1 min | 1 min | 1 min |
| Zyklus 42 | 1 min | - | - |

Für die Validierung der Primer wurde ein Verdünnungsreihe von cDNA aus TCDD inkubierten Primärhepatozyten verwendet.

2.2.13 Topoisomerase-Assays

Die doppelhelikale Struktur der DNA ist essentiell für die korrekte Weitergabe ihrer genetischen Information, behindert allerdings auch Prozesse wie z.B. DNA-Replikation, -Transkription und -Reparatur. Topoisomerasen sind Enzyme, die in der Lage sind, die Topologie der DNA zu ändern. Sie entspiralisieren, entwinden oder entknoten zum Beispiel die DNA, indem sie DNA-Strangbrüche einführen und sie nach Umstrukturierung wieder verschließen. Es gibt 2 Klassen, Topoisomerase I und II. Die Topoisomerase I generiert einen Einzelstrangbruch über Bildung eines 'Cleavable Complex'. Die Relaxation erfolgt durch die Passage des Einzelstrangs durch den Strangbruch. Nachfolgend wird die DNA religiert. Topoisomerase II mit ihren Isoformen α und β unterscheidet sich durch ihre Fähigkeit, einen transienten Doppelstrangbruch einzuführen, durch den ein zweiter Strang wandert. Dann erfolgt die Religation. (Bailly, 2000; Barthelmes et al., 2001; Champoux, 1994 und 2001; Malonne und Atassi, 1997; Osheroff, 1989; Wang, 1985)

Die Applikationslösungen der Testsubstanzen werden vor jedem Versuch in DMSO unter Lichtausschluß hergestellt. Die Konzentrationen betragen 300 μ M und 3 mM, was einer Endkonzentration im Versuch von 10 und 100 μ M entspricht. Die Versuche werden unter streng definierten Lichtverhältnissen durchgeführt. Je nach Versuchsansatz erfolgt die erste Inkubation unter absolutem Lichtausschluss, nach 15 minütiger Inkubation mit Tageslicht und nach UV-Bestrahlung (254 nm) für 5 min.

2.2.13.1 Relaxationsassay (Topoisomerase I)

Die Topoisomerase I Aktivität wird durch die Überführung einer DNA in der superspiralisierten Plasmidform in deren relaxierte Form bestimmt.

Tabelle 2.17: Reaktionsansatz pro Probe

| Lösungen | pUC18 [μ l] | pUC18 + Kern- extrakt [μ l] | pUC18 + Kern- extrakt + Test- substanz [μ l] |
|---|------------------|-------------------------------------|---|
| H ₂ O bidest (ad 30 μ l) | 17 | 14 | 13 |

| | | | |
|----------------------------|---|---|---|
| Saltmix I * | 3 | 3 | 3 |
| Tris (100 mM, pH 7,9) * | 3 | 3 | 3 |
| KCl (1 M) * | 3 | 3 | 3 |
| pUC18 | 4 | 4 | 4 |
| Testsubstanz | - | - | 1 |
| Kernextrakt | - | 3 | 3 |

* Herstellung eines Mix und Zugabe von je 9 μ l

Die aufgeführten Komponenten werden in der angegebenen Reihenfolge auf Eis pipettiert, gemischt und nachfolgend für 30 min bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Nach Zugabe von je 6 μ l Proteinkinase K (10 mg/ml) : 5% SDS im Verhältnis 1 : 1 erfolgt eine erneute Inkubation unter gleichen Bedingungen für 30 min. Nach Zugabe von je 6 μ l Ladepuffer wird eine Gelelektrophorese auf einem 1%igen Agarosegel in 1x TAE-Puffer bei 70 V für ca. 1,5 h durchgeführt. Zur Detektion wird das Gel 10 min mit Ethidiumbromid-Lösung angefärbt und dann 5 min mit Wasser gespült. Die Detektion erfolgt am Lumi-Imager.

2.2.13.2 Decatenierungsassay (Topoisomerase II)

Hierbei erfolgt die Bestimmung der Aktivität über die Umwandlung von Kinoplasten DNA, die aus vernetzten DNA Zirkeln besteht, in getrennte DNA Zirkel.

Es wird je ein separater Ansatz für Topoisomerase II α und β untersucht.

Tabelle 2.18: Reaktionsansatz pro Probe

| Lösungen | kDNA [μ l] | kDNA + Topoi- somerase II [μ l] | pUC18 + Topoi- somerase II + Testsubstanz [μ l] |
|----------|-----------------|---|---|
|----------|-----------------|---|---|

| | | | |
|---------------------------------------|------|------|------|
| H ₂ O bidest (ad 30 µl) | 19,7 | 18,7 | 17,7 |
| Saltmix II * | 3 | 3 | 3 |
| Tris (500 mM, pH 7,9) * | 3 | 3 | 3 |
| KCl (1 M) | 3,6 | 3,6 | 3,6 |
| kDNA, ca. 200 ng | 0,7 | 0,7 | 0,7 |
| Testsubstanz | - | - | 1 |
| Topoisomerase II | - | 1 | 1 |

* Herstellung eines Mix und Zugabe von je 6 µl

Der Ansatz wird auf Eis pipettiert, gevortext und 60 min bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Je 3 µl Proteinkinase K (1 mg/ml in 10% SDS) werden zugegeben und nach 30 min bei 37°C wird die Inkubation beendet. Die Proben werden mit je 5 µl Ladepuffer gemischt und je 20 µl auf ein Agarosegel (1%) aufgetragen. Die Gelelektrophorese erfolgt in TAE-Puffer bei 70 V für 1,5 h. Färbung und Detektion werden analog des Relaxationsassays durchgeführt.

2.2.14 Analyse von Bakterienkulturen aus Rattenfeces mit Tryptophan

Das hier angewandte Verfahren dient zur Herstellung und Isolierung AhR-aktiver Tryptophan-Metabolite aus Fermentationen mit Rattenfeces in Anwesenheit von Tryptophan. Die Inkubation von Primärhepatozyten und H4IIE-Zellen und die Bestimmung der AhR-vermittelten EROD-Aktivität zur Identifizierung der AhR-Liganden erfolgt wie zuvor beschrieben.

2.2.14.1 Fermentation

Das hier verwendete Verfahren beruht grundsätzlich auf der von Perdew und Babs entwickelten Methode zur Herstellung von Tryptophan-Metaboliten aus Rattenfeces-Fermentation (Perdew und Babs, 1991). Zur Optimierung der Reaktionsbedingungen werden verschiedene Modifikationen getestet. Alle verwendeten Lösungen und Materialien sind steril. Die Fermentation erfolgt unter Licht- und Luftausschluss.

A)

Die benötigte Menge an Rattenfeces wird unter möglichst sterilen Bedingungen direkt bei Darmaustritt mit einer Pinzette gesammelt und in ein 50 ml-Falcon überführt. Je 1 g des Rattenkots werden in 25 ml Fermentationspuffer im Ultraschallbad homogenisiert und in je einen 2 l-Schikanekolben überführt, in dem je 1 l Fermentationspuffer mit 10 ml Glucose-Lösung (10%; steril; Lagerung bei 4°C) und 0,204 g Tryptophan (Endkonzentration in der Lösung 1 mM) vorgelegt werden. Die Bakteriensuspensionen werden für 24 h bei 37°C und 250 rpm im Bakterienschüttler inkubiert. Als Blindansatz dient eine Suspension gleicher Zusammensetzung ohne Zusatz von Tryptophan. Die Lagerung erfolgt lichtgeschützt bei 4°C.

B)

Zur Selektierung und Anreicherung von Bakterienkulturen aus Rattenfeces werden zwei Ansätze mit unterschiedlichem Glukose-Gehalt (F1: 1 g/l; F3: 3 g/l) untersucht.

Tabelle 2.19: Zusammensetzung der Fermentationsansätze

| Ansatz F1 | Ansatz F3 |
|-----------------------------------|-----------------------------------|
| 1 g homogenisierte Rattenfeces in | 1 g homogenisierte Rattenfeces in |
| 1 l LB-Medium | 1 l LB-Medium |
| + 10 ml Glukose (10%) | + 30 ml Glukose (10%) |
| + 0,204 mg Tryptophan | + 0,204 mg Tryptophan |

Mehrere Schikanekolben werden mit den Suspensionsansätzen befüllt und unter den in A) genannten Bedingungen inkubiert. Nach 24 h wird ein Teil der Ansätze zur Extraktion und Analyse verwendet, während 50 ml der Kultur in einen neuen Ansatz gleicher Zusammensetzung ohne Rattenfeces überführt werden. Diese werden erneut 24 h inkubiert und danach wie zuvor beschrieben in frische Fermentationslösungen überimpft. Die gesamte Inkubation erfolgt über einen Zeitraum von 7 Tagen.

Des Weiteren werden von jeder Kultur Glyzerinstocks hergestellt. Hierbei werden 600 µl der Kultur mit je 500 µl Glycerin (80%) versetzt, gevortext und bei -80°C gelagert.

C)

Je 10 ml der Bakterienkultur nach einer Inkubationszeit von 7 Tagen aus den Fermentationsansätzen bei B) werden in 1 l Fermentationspuffer mit 10 ml Glukose-Lösung (10%) und 0,204 g Tryptophan überführt und unter den oben stehenden Bedingungen für 24 h inkubiert.

D)

Die benötigten, in B) hergestellten Glyzerinstocks werden aufgetaut und die Bakterien in 50 ml Fermentationspuffer, dem 500 µl Glukose-Lösung (10 %) und 0,01 g Tryptophan zugesetzt werden, über Nacht bei 37°C und 250 rpm im Bakterienschüttler vorkultiviert. Je 10 ml dieser Kultur werden nachfolgend in 1 l Fermentationsansatz (1 l Fermentationspuffer, 10 ml Glukose-Lösung (10%) und 0,204 g Tryptophan) überführt und für 24 h unter gleichen Bedingungen inkubiert.

2.2.14.2 Aufreinigung

Für die Aufreinigung der Suspensionen werden folgende Verfahren verwendet und die Bedingungen optimiert:

- Filtration über einen Grobfilter am Wasserstrahlvakuum
- Zentrifugation
- Filtrationen über ein festes Mikrofiltersystem (Durchmesser $0,45\text{ }\mu\text{m}$) mit Vorfilteranlage
- Die Aufreinigung erfolgt lichtgeschützt.

2.2.14.3 Extraktion

Die Extraktion wird soweit möglich unter Lichtausschluss mit verschiedenen Lösungsmitteln bzw. –gemischen durchgeführt. Hierbei werden die wässrigen Lösungen mit je 45% des Ausgangsvolumens an Extraktionsmittel versetzt und für 30 bis 60 min stark durchmischt. Dies erfolgt je nach Menge der Gemische in einer abgedunkelten Flasche auf einem Magnetrührer oder in einer Extraktionskugel. Nach der Phasentrennung wird die Lösungsmittelphase gleicher Fermentationsansätze gesammelt, vereinigt und bei 4°C im Dunkeln gelagert.

Die Einengung der Extrakte wird bei Dunkelheit am Rotationsverdampfer bei einer Wasserbadtemperatur von 40°C und einem regulierten Ölpumpenvakuum von 200-250 mbar durchgeführt. Die vollständige Trocknung erfolgt bei 0 mbar für 6-8 h. Die Rohextrakte werden bei 4°C lichtgeschützt gelagert.

2.2.14.4 Festphasenextraktion

Die Festphasenextraktionen werden nach dem hier entwickelten Verfahren durchgeführt (Pfeffer, 2001). Dabei wird hier anhand der gefundenen Ergebnisse zur Aufreinigung und Anreicherung der gewünschten Produkte nur die C_{18ec}-Festphase verwendet, da die anderen Schritte keine sinnvollen Ausbeuten und Reinigungseffekte zeigten (Pfeffer, 2001).

Der Rohextrakt wird einer definierten Menge Ethylacetat aufgenommen und auf eine mit 30 ml MeOH konditionierte und mit 20 ml Ethylacetat vorbereitete C_{18ec}-Festphase gegeben. Der Fluss beträgt ca. 3 ml/min unter manuellem Druck. Die Säule wird mit 30 ml Ethylacetat gewaschen und an der Luft getrocknet. Die Elution des aufgereinigten Produkts erfolgt mit 30 ml Petrolether bei einer Geschwindigkeit von 1 ml/min. Das Eluat wird bei 40°C Wasserbadtemperatur und 0-250 mbar im Vakuum getrocknet und bei 4°C gelagert.

2.2.15 `High pressure liquid chromatography` (HPLC)

Alle verwendeten Lösungsmittel und –gemische sind HPLC geeignet und entgast.

2.2.15.1 Probenvorbereitung

Die gewonnenen Extrakte werden in einer definierten Menge an Methanol aufgenommen, im Ultraschallbad homogenisiert und über einen Filter (Zelluloseacetat; 0,2 µm) von eventuell unlöslichen Partikeln befreit.

2.2.15.2 Messmethoden

Die Untersuchungen werden an einem Beckman Gold HPLC-System durchgeführt, ausgestattet mit der Beckman Gold Nouveau bzw. Karat 3.2- Software. Die verwendeten 8 x 250 mm Säulen sind mit Partisil ODS-3, 5 µm gefüllt. Die 4,6 x 20 mm Vorsäule (Nucleosil 100 C₁₈; 5 µm) wird alle 5 Läufe erneuert. Als Detektionswellenlängen wurden 254 und 280 nm verwendet. Zur Optimierung der Analyse der Rohextrakte und nachfolgenden Charakterisierung der aufgereinigten Produkte werden folgende Messeinstellungen verwendet:

Tabelle 2.20: Verwendete HPLC-Methoden

| Programmnummer; Verfahren | Lösungsmittel | Verhältnis | Flussrate [ml/min] | Zeit [min] |
|------------------------------|---|------------|-----------------------|------------|
| 1(a/b/c); isokratisch | (a/b) Methanol : | 70 : 30 | (a/c) 3 | (a/b) 30 |
| | H ₂ O | | (b) 1 | (c) 20 |
| | (c) Methanol : H ₂ O | 80 : 20 | | |
| 2; gradient | Methanol : H ₂ O | 50 : 50 => | 3 | |
| | | 100 : 0 | | 8 |
| | | 100 : 0 | | 2 |
| 3; gradient | o-Phosphorsäure (0,1%) : Acetonitril | 100 : 0 => | 2 | |
| | | 0 : 100 | | 15 |
| | | 0 : 100 | | 1 |

| | | | | |
|-----------------------|-------------------------------|------------|---|-----|
| 4; gradient | Acetonitril + | 10 : 90 => | 3 | |
| | 0,1% Tfa : H ₂ O + | 100 : 0 | | 45 |
| | 0,1 % Tfa | | | |
| 5; isokratisch | Acetonitril + 0,1% | 40 : 60 | 3 | 4,5 |
| | Ameisensäure : | 90 : 10 | | 2,5 |
| | Ammoniumformiat | 0 : 100 | | 5 |
| | (5 mM; pH 3) | | | |

2.2.15.3 Fraktionierung

Es werden während der HPLC-Analyse Fraktionen über 1 min beginnend nach der Injektion des Extraktes gesammelt und über mehrere Läufe gepoolt. Die Spüllösung nach dem Lauf wird ebenfalls aufgefangen. Die Fraktionen werden bei 40°C im Wasserbad unter moderatem Stickstoffstrom eingengt und nachfolgend für 5-6 h an der SpeedVac getrocknet.

2.2.16 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgt mit dem GraphPad InStat Programm 3.0 (GraphPad Software, San Diego, USA). Die Ergebnisse werden als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt. Es wurden - wenn nicht separat angegeben – mindestens 3 unabhängige Messreihen durchgeführt. Die experimentellen Werte, die signifikant abweichen von der Kontrolle ($P \leq 0,05$), sind mit einem Stern (*) gekennzeichnet. Eine stark signifikante Abweichung ($P \leq 0,01$) wird mit zwei Sternen (**) markiert.

3 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

3.1 Furocumarine

Wie zuvor in Abschnitt 1.5 beschrieben, sollten die Effekte einiger ausgewählter natürlich in Nahrungsmitteln auftretenden Furocumarine auf den AhR-Signalweg untersucht werden. Für diese Studien wurden die linearen Furocumarine 8-MOP, Isopimpinellin, Bergamottin und 6',7'-Dihydroxybergamottin (DHB) sowie Angelicin als angularer Vertreter dieser Substanzen verwendet.

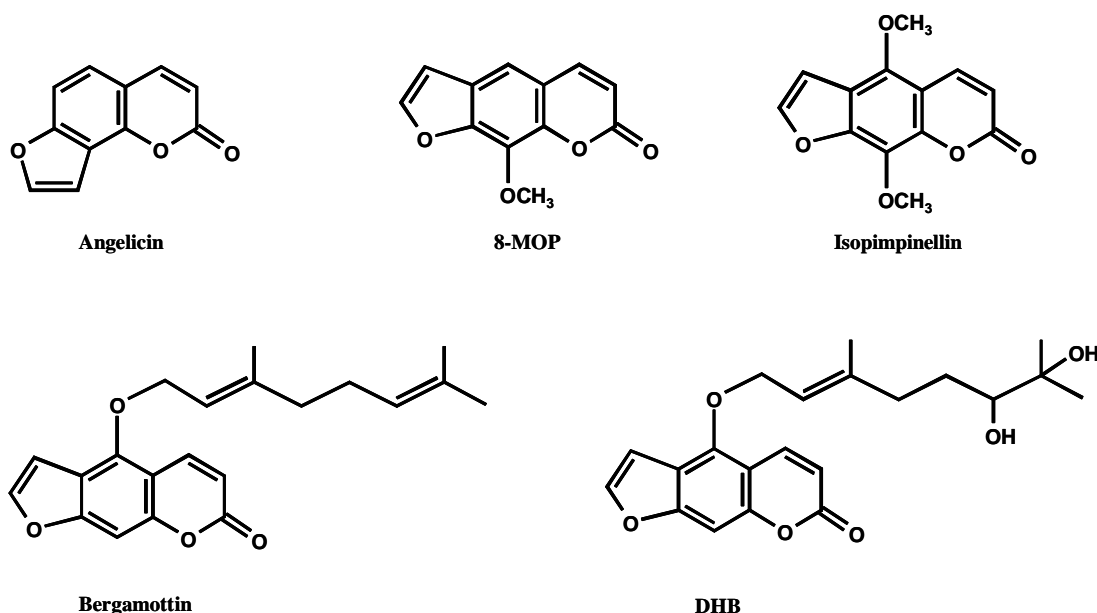


Abbildung 3.1: Strukturen der Furocumarine

8-MOP wurde ausgewählt aufgrund seiner weiten Verbreitung in pflanzlichen Lebensmitteln und seines Einsatzes in der Medizin (PUVA-Therapie) sowie aufgrund der bereits beschriebenen Effekte auf die CYP1A Expression *in vivo* und *in vitro*.

Isopimpinellin unterscheidet sich strukturell nur in einer zusätzlichen Methoxygruppe von 8-MOP und kommt ebenfalls in einer Vielzahl von Pflanzen vor. Bergamottin ist bekannt als potenter Hemmstoff von CYP1A2 und CYP3A4 und wird verantwortlich gemacht maßgeblich zu Wechselwirkungen von Grapefruitsaft mit Pharmazeutika beizutragen. (Bailey et al.,

2003; He et al., 1998; Malhotra et al., 2001; Mays et al., 1990; Sahi et al., 2002; Tassaneeyakul et al., 2000)

Auch mit dem sehr potenten CYP3A4-Inhibitor DHB wurden einige Untersuchungen durchgeführt, allerdings konnte aufgrund der geringen zur Verfügung stehenden Menge keine vollständige Charakterisierung seiner Effekte auf den AhR und die CYP1A1 Inhibition erfolgen. Das verwendete DHB wurde freundlicherweise von Prof. Petersen, University of Illinois, USA, zur Verfügung gestellt.

Die Inkubation der Zellen mit Furocumarinen erfolgte unter definierten Lichtverhältnissen. 'Licht' bedeutet in diesem Zusammenhang, dass die Zellen unter Tageslicht und/oder normaler Zimmerbeleuchtung behandelt wurden, während 'unter Lichtausschluss' (LA) bzw. bei 'Dunkelheit' heißt, dass das Herstellen und die Lagerung der Applikationslösungen ebenso wie die Inkubation ohne Tageslicht (abgedunkelter Bereich) bzw. unter Rotlicht stattfanden.

3.1.1 Einfluss der Furocumarine auf die EROD-Aktivität

Die CYP1A-vermittelte EROD-Aktivität wurde unter verschiedenen Aspekten in Rattenhepatozyten in Primärkultur nach Inkubation mit Furocumarinen und/oder TCDD (1 nM) untersucht. Unabhängig von der experimentellen Methodik wurden die Zellen jeweils für 48 h mit den Testsubstanzen in verschiedenen Konzentrationen bzw. den Kontrollen DMSO und TCDD (1 nM) unter definierten Lichtverhältnissen inkubiert.

Die Zellaufarbeitung und Bestimmung der EROD-Aktivität erfolgte wie in Abschnitt 2 beschrieben. Die unterschiedlichen Versuchsdurchführungen des EROD-Assays kamen durch Etablierung und Optimierung der einzelnen Verfahren während der Arbeit zustande. Untersuchungen an bekannten EROD-Induktoren ergaben, dass keine Unterschiede bei der regressiven Analyse der Daten auftreten und diese Methoden daher als äquivalent anzusehen sind (Schneiders, 2001).

3.1.1.1 EROD-Aktivität in Furocumarin-inkubierten primären Rattenhepatozyten

Die EROD-Aktivität in Primärhepatozyten der Ratte wurde nach der Inkubation mit Furocumarinen bestimmt. Als Referenzen dienten das Lösungsmittel DMSO und TCDD (T) in einer Konzentration von 1 nM. Es wurden n=3 unabhängige Messreihen durchgeführt. Die Ergebnisse sind nachfolgend dargestellt.

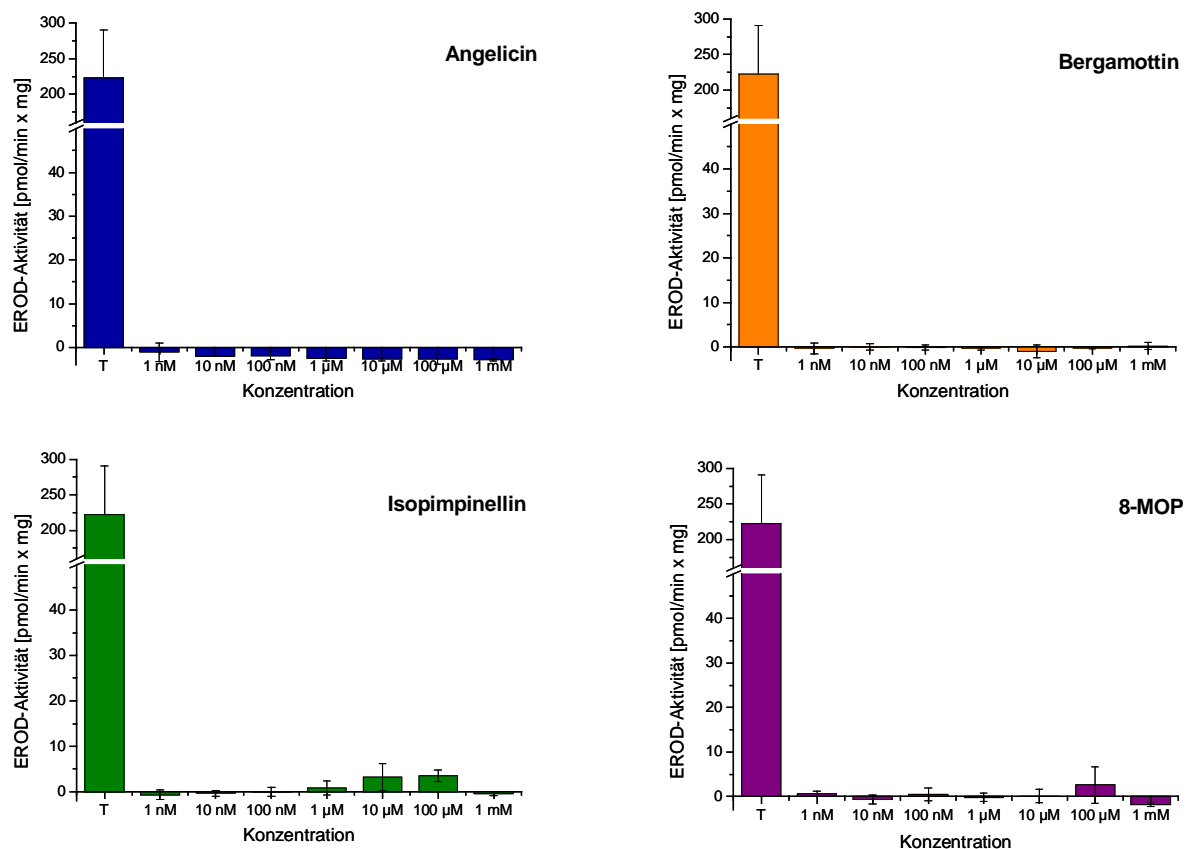


Abbildung 3.2: EROD-Aktivität von bei Licht mit Furocumarin inkubierten primären Rattenhepatozyten

Alle untersuchten Furocumarine zeigen unter Lichteinfluss keine Induktion der CYP1A-vermittelten EROD-Aktivität und die EROD-Aktivität lag im Bereich der DMSO-Kontrollen, während für die Positivkontrolle TCDD ein deutlicher induktiver Effekt zu beobachten ist.

Bei in Dunkelheit inkubierten Rattenhepatozyten ergab sich das gleiche Bild. Auch hier ist nahezu keine EROD-Aktivität - ausgenommen bei der Positivkontrolle - nachweisbar, was nicht für eine Induktion von CYP1A durch die vier Substanzen spricht.

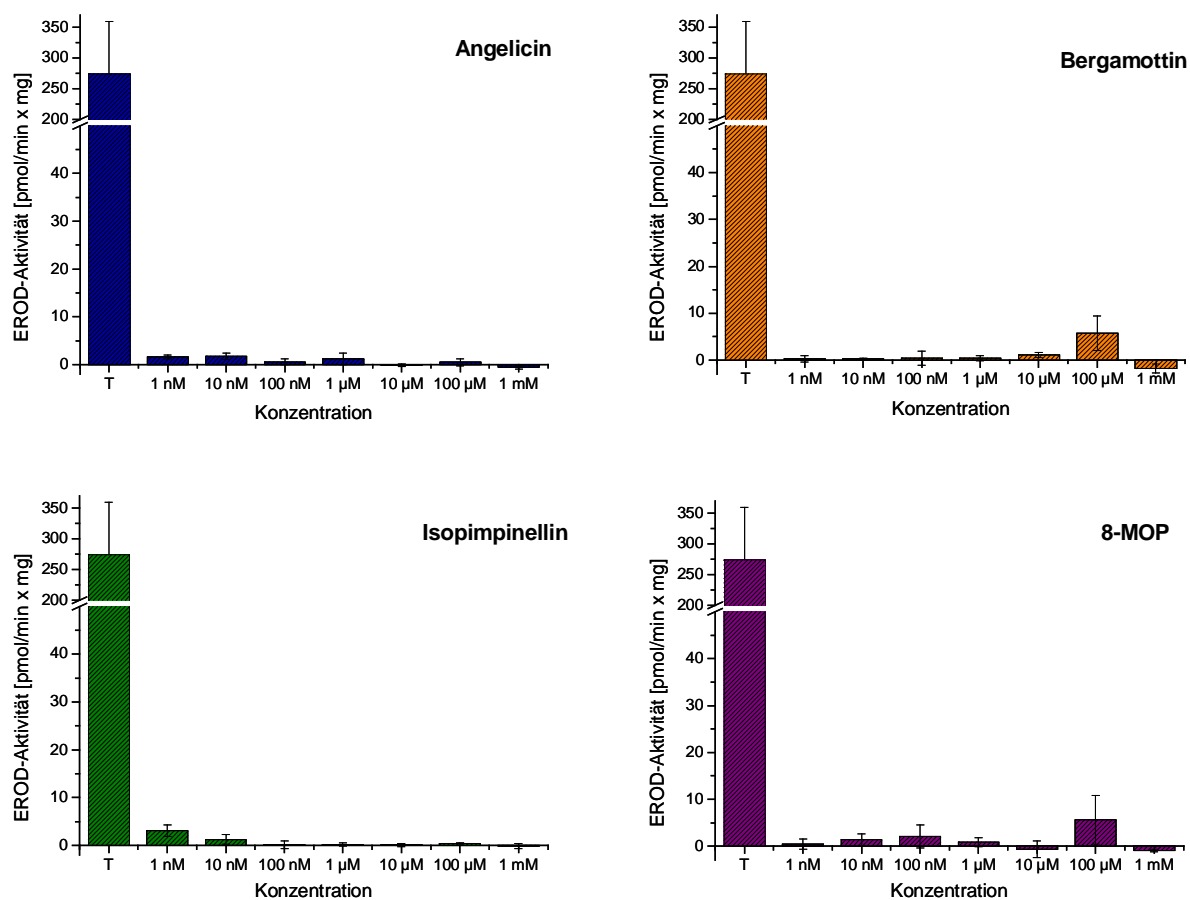


Abbildung 3.3: EROD-Aktivität von in Dunkelheit mit Furocumarin inkubierten primären Rattenhepatozyten

Damit wird gezeigt, dass keine CYP1A-Enzymaktivität erfolgt. Allerdings kann aufgrund der bekannten inhibitorischen Eigenschaften dieser Verbindungen auf andere CYP-Isoenzyme als 'Suizid' substrate eine Induktion der CYP1A Expression über den AhR nicht ausgeschlossen werden.

3.1.1.2 EROD-Aktivität bei Koinkubation mit TCDD

Primäre Rattenhepatozyten wurden simultan mit TCDD (1 nM) und Furocumarinen in unterschiedlichen Konzentrationen unter definierten Lichtverhältnissen inkubiert und danach der Effekt auf die Enzyminduktion bestimmt. Um eventuelle direkte Wirkungen der Verbindungen auf CYP1A nachzuweisen, wurden Mikrosomen aus TCDD inkubierten Zellen mit den Furocumarinen für 10 min bei Licht bzw. Dunkelheit präinkubiert und danach die EROD-Aktivität bestimmt. Es wurden $n \geq 3$ unabhängige Messreihen durchgeführt.

Generell ist unabhängig von den unterschiedlichen Zellsystemen und Inkubationsbedingungen eine Inhibition der TCDD-induzierten EROD-Aktivität zu beobachten. Dies bestätigten schon bekannte Studien über inhibitorische Effekte von Furocumarinen wie Bergamottin auf die Ligand-induzierte CYP1A-Aktivität in Lebermikrosomen der Maus und des Menschen (Cai et al., 1993; Tassaneeyakul et al., 2000; Wen et al., 2002).

Aus den gewonnenen Daten konnten die IC_{50} -Werte für die einzelnen Substanzen abgeleitet werden (Software Origin 6.1, OriginLab Corporation, USA). Die grafische Regression ist in in Abbildung 3.4 visualisiert. Die IC_{50} -Werte sind in der nachfolgenden Tabelle zusammengefasst.

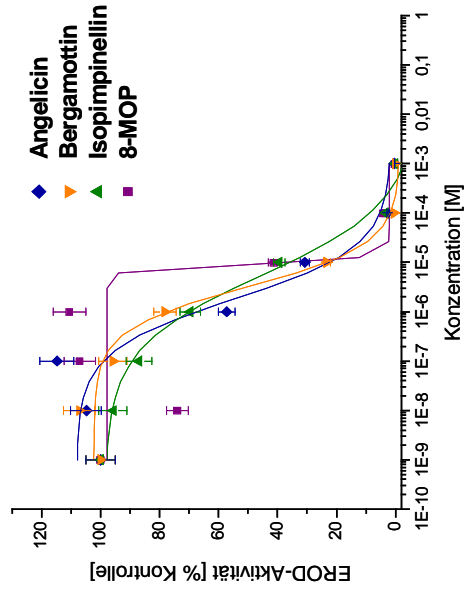
Tabelle 3.1: IC_{50} -Werte [μM] \pm CI (95%) der EROD-Aktivität bei Koinkubation von TCDD mit den Furocumarinen in Hepatozyten und der Präinkubation von Mikrosomen bei Licht und Lichtausschluss (LA)

| Furocumarin | Hepatozyten | | Mikrosomen | |
|-----------------------|-----------------|------------------|--------------------|--------------------|
| | IC_{50} | | IC_{50} | |
| | Licht | LA | Licht | LA |
| Angelicin | $1,86 \pm 1,13$ | $1,36 \pm 0,75$ | $0,311 \pm 0,218$ | $11,75 \pm 0,92$ |
| Bergamottin | $1,80 \pm 0,32$ | $15,66 \pm 6,05$ | $0,010 \pm 0,0001$ | $0,057 \pm 0,0016$ |
| Isopimpinellin | $5,40 \pm 1,92$ | $2,39 \pm 4,60$ | $0,015 \pm 0,003$ | $1,36 \pm 0,31$ |
| 8-MOP | $9,49 \pm 0,06$ | $2,74 \pm 1,31$ | $1,07 \pm 0,396$ | $12,44 \pm 5,79$ |

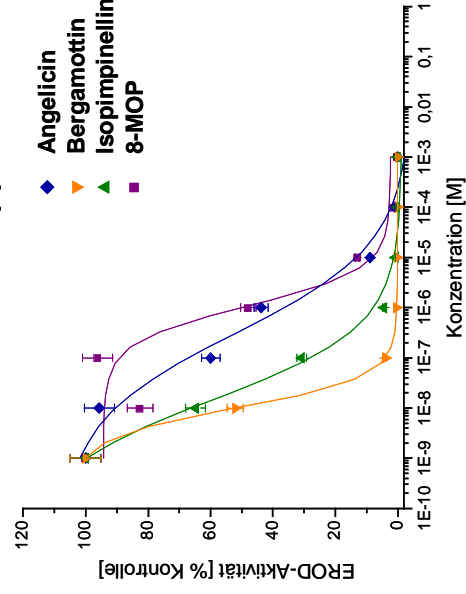
Eine Dosisabhängige Hemmung der EROD-Aktivität wird ab einer Furocumarinkonzentration von etwa $0,1 \mu M$ beobachtet. Alle Furocumarine hemmen die EROD-Aktivität bei höheren Konzentrationen zu etwa 100%.

Die IC_{50} -Werte der Substanzen variieren sowohl in Abhängigkeit von den eingesetzten Substanzen als auch in Abhängigkeit von der Belichtung und vom verwendeten Zelltyp. Die Reihenfolge der inhibitorischen Potenz bei unterschiedlichen Inkubationsbedingungen ist nachfolgend aufgelistet:

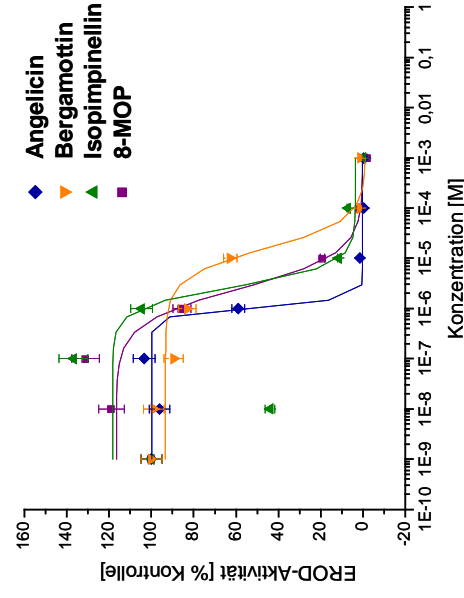
A 1¹



B 1



A 2



B 2

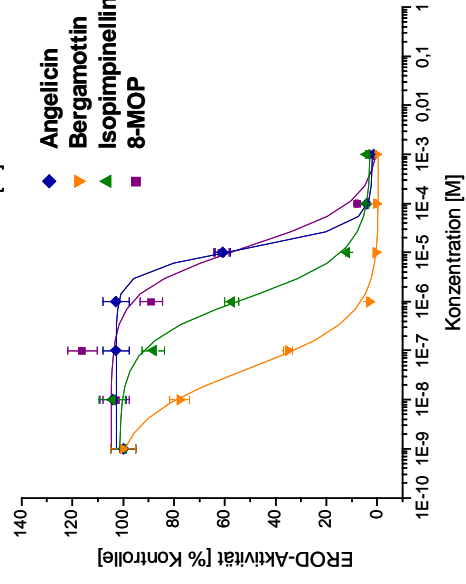


Abbildung 3.4: Inhibition der EROD-Aktivität durch Furocoumarine; A: in primären Rattenhepatozyten, B: in Mikrosomen; 1: Licht, 2: Lichtausschluss;
¹ Daten wurden teilweise im Rahmen einer Forschungsarbeit erhoben (Schmidt, 2002)

Hepatozyten

- Licht Bergamottin \approx Angelicin > Isopimpinellin > 8-MOP
- Lichtausschluss Angelicin > Isopimpinellin > 8-MOP > Bergamottin

Mikrosomen

- Licht Bergamottin > Isopimpinellin > Angelicin > 8-MOP
- Lichtausschluss Bergamottin > Isopimpinellin > Angelicin > 8-MOP

Die IC₅₀-Werte der Präinkubation in Mikrosomen bei Licht sind generell wesentlich geringer als die vergleichbaren Daten für die Koinkubation der Primärhepatozyten und zeigen die niedrigsten IC₅₀-Werte aller experimentellen Varianten. Bergamottin ist in beiden Zellmodellen bei Licht der potenteste Inhibitor der CYP1A-abhängigen EROD-Aktivität, allerdings mit einem etwa 200fach niedrigeren IC₅₀-Wert in Mikrosomen. 8-MOP zeigt hierbei das geringste inhibitorische Potential, wobei sich die IC₅₀-Werte nur um den Faktor 9 unterscheiden. In Mikrosomen hemmt Isopimpinellin bei Licht die EROD-Aktivität stärker im Vergleich zu Angelicin als in lebenden Zellen, wo Angelicin eine höhere inhibitorische Potenz aufweist.

Dies kann teilweise auf die schlechtere Löslichkeit und Verteilung von Isopimpinellin im Zellkulturmedium verglichen mit Angelicin unabhängig von den Lichtverhältnissen zurückgeführt werden. Des Weiteren spielen bei der Inkubation des intakten Zellsystems der Primärhepatozyten unter anderem die Verteilung und Aufnahme, der Metabolismus und die Elimination der Furocumarine eine entscheidende Rolle für die inhibitorische Effektivität auf die EROD-Aktivität. Ein Hinweis auf eine mögliche veränderte Aufnahme in die Zelle wird durch Studien mit Grapefruitsaft belegt. Im Saft enthaltene Furocumarine stehen im Verdacht, die Funktion von P-Glykoprotein, einem ATP-abhängigen Transportprotein, zu hemmen. (Dresser und Bailey, 2003; Edwards et al., 1999; Ohnishi et al., 2000; Wang et al., 2001) Allerdings ist noch nicht geklärt, ob und welche Furocumarine eventuell Substrate für Trans-

portproteine darstellen können oder ob sie auf anderem Weg wie Diffusion die Zellmembran passieren.

Die wesentlich höhere Potenz aller Verbindungen bei Licht in Mikrosomen deutet auf einen direkten inhibitorischen Effekt auf CYP1A hin. Wie im einleitenden Abschnitt erläutert, sind Furocumarine Mechanismus-basierte Inhibitoren verschiedener CYP-Isoenzyme und blockieren deren Aktivität durch Bindung an das Enzym. (Cai et al., 1996; Fouin-Fortunet et al., 1986). Bei der Präinkubation von Mikrosomen erfolgt wahrscheinlich eine metabolische Aktivierung des Furocumarins über CYP-Isoenzyme, je nach Substratstärke und Lichtaktivierung der einzelnen Derivate, und eine direkte irreversible Hemmung durch Bindung an das Enzym. Cai et al. konnten bereits für Coriandrin zeigen, dass NADPH und damit eine metabolische Umsetzung nötig ist, um die inhibitorische Aktivität auf CYP1A1 und 1A2 auszulösen (Cai et al., 1996). Dies spricht dafür, dass alle vier Furocumarine 'Suizid' Substrate für CYP1A sein könnten. Dieser Sachverhalt wurde auch in den nachfolgend beschriebenen Experimenten untersucht.

Weiterhin ist auch zu beachten, dass bei der Präinkubation keine Konzentrationsverluste an Furocumarin durch physiologische Prozesse wie in intakten Zellen auftreten (Aufnahme in die Zelle, Elimination, Reaktion mit Zellproteinen etc.), sondern die gesamte Menge an Substanz für die Reaktion mit mikrosomalen Proteinen zur Verfügung steht.

Vergleicht man die IC_{50} -Werte in Primärhepatozyten bei unterschiedlichen Lichtverhältnissen, so liegen alle im Bereich von 1,8 bis 9,5 μM mit Ausnahme von Bergamottin (15,66 μM ; LA). Auffallend ist, dass die Reihenfolge der inhibitorischen Potenz für Angelicin, Isopimpinellin und 8-MOP unabhängig ist von dem Beleuchtungsstatus und die genannten Furocumarine bei Dunkelheit einen geringeren IC_{50} -Wert aufweisen als bei Licht. Bergamottin dagegen löst bei der Zellinkubation unter Licht den stärksten Hemmeffekt auf die EROD-Aktivität aus, während dieser bei Dunkelheit etwa um den Faktor 9 schwächer ist und damit am Ende der Potenzreihe steht.

Das spricht für eventuelle Unterschiede dieser Furocumarine in Bezug auf ihre metabolische Aktivität nach Lichteinfluss. Licht fördert durch seinen UV-Anteil photochemische Reaktionen, während bei Dunkelheit enzymgesteuerte oxidative Prozesse bevorzugt ablaufen, was zur Generierung anteilmäßig verschiedener Intermediate und Folgereaktionen führen kann.

Es könnte auch ein Indiz für ein unterschiedliches induktives Verhalten auf den AhR-Signalweg sein, wenn davon ausgegangen wird, dass die Verbindungen ihren eigenen Metabolismus katalysieren und das hierbei induzierte CYP1A Enzym hemmen. Dies würde dann zu einem niedrigeren IC_{50} -Wert der Substanz aufgrund der beschleunigten Metabolisierung führen. Das ist bei Angelicin, Isopimpinellin und 8-MOP bei Dunkelheit in Hepatozyten der Fall, auch wenn der Effekt nicht sehr ausgeprägt ist.

Bergamottin verhält sich komplett invers in diesem Inkubationssystem. Da der strukturelle Unterschied zu den anderen linearen Furocumarinen in der langen Seitenkette liegt, scheint diese einen maßgeblichen Effekt auf die Art der Metabolisierung und die Verfügbarkeit der Substanz in der Zelle zu haben. Das könnte nachfolgend auch eine mögliche Induktion des CYP1A über den AhR beeinflussen, z.B. durch Licht-induzierte Beeinträchtigung der Funktionalität der unterschiedlichen AhR-Komplexe sowie der transkriptionellen und posttranskriptionellen Prozesse. Hierfür spricht auch die Tatsache, dass Bergamottin im EROD-Assay in Mikrosomen sowohl bei Licht als auch in Dunkelheit eine sehr starke Inhibition der Enzymaktivität zeigt.

Das relative inhibitorische Potential der Furocumarine zueinander in Mikrosomen ist unabhängig von den Lichtverhältnissen. Die IC_{50} -Werte bei Dunkelheit liegen für alle Verbindungen signifikant über denen unter Lichteinfluss, d.h. sie sind schwächere Inhibitoren unter Lichtausschluss. Bergamottin ist auch hier der potenteste Inhibitor mit einem Unterschied um das ca. 6fache für dunkle verglichen mit hellen Inkubationsbedingungen. 8-MOP zeigt eine Differenz im IC_{50} -Wert um das 12fache, während Isopimpinellin um das 18fache und Angelicin um das 38fache divergieren.

Dies steht im Gegensatz zu den Ergebnissen in Primärhepatozyten, wo die Potenz von Angelicin, Isopimpinellin und 8-MOP unter Lichteinfluss abnimmt. Eine Erklärung hierfür könnte darin liegen, dass Licht die Möglichkeit der Substanzen erhöht, direkt mit mikrosomalen Proteinen zu interagieren und kovalent an die CYP1A Enzyme zu binden und damit deren Funktionalität zu beeinflussen. In Hepatozyten besteht dagegen kein unmittelbarer Kontakt mit mikrosomalem Enzym, so dass die Substanzen möglicherweise vorher mit anderen Makromolekülen reagieren. Experimente über die Reaktionsfähigkeit von Furocumarinen mit Makromolekülen wie Proteinen unterstützen diese Hypothese. (Caffieri, 2002; Schmitt et al., 1995)

Insgesamt unterscheiden sich die IC_{50} -Werte für alle Experimente mit Bergamottin um das etwa 1570fache, Isopimpinellin zeigt eine Varianz um den Faktor 360, während bei Angelicin und 8-MOP die IC_{50} -Werte nur etwa um das 38fache und 12fache auseinanderliegen. Das unsubstituierte Angelicin und 8-MOP mit einer Methoxygruppe sind am stabilsten in ihrer inhibitorischen Wirkung auf die CYP1A-vermittelte EROD-Induktion, während Isopimpinellin und Bergamottin, das eine mit zwei Methoxygruppen und das andere mit einen sterisch anspruchsvollen Substituenten, sehr stark in ihrer Potenz divergieren. Diese Ergebnisse sprechen für einen komplexeren Mechanismus der Inhibition durch Isopimpinellin und Bergamottin und für die starke Abhängigkeit ihrer Reaktivität von äußeren Bedingungen wie den Lichtverhältnissen. In Hinblick auf den Einsatz der Furocumarine als Inhibitoren für CYP1A ist somit nicht nur die verwendete Konzentration von Bedeutung, sondern auch das zu untersuchende Zellsystem und davon abhängig die Lichteinwirkung.

Studien mit aufgereinigtem humanem CYP1A1 Enzym ergaben einen IC_{50} -Wert für Bergamottin von 0,37 bzw. 0,6 μM , einem ungefähr 6 bis 60mal höheren Wert als die in dieser Arbeit ermittelten IC_{50} -Werte in Rattenmikrosomen (Cai et al., 1996; Kleiner et al., 2003). Die IC_{50} -Werte von Bergamottin in humanen Lebermikrosomen liegen für CYP1A2, 2C9 und 2C19 im Bereich von ca. 0,3 μM , während CYP2E1 einen IC_{50} von etwa 0,2 μM aufweist. Für CYP3A4 wurden IC_{50} -Werte ermittelt die etwa 3-6mal höher lagen. (Tassaneeyakul et al., 2000) Signifikante Selektivitätsunterschiede für die Inhibition der CYP-Isoenzyme im Menschen durch Bergamottin lassen sich nur für CYP3A4 ableiten, wobei Kleiner et al. teilweise relativ differente Daten mit humanem aus cDNA exprimierten CYP-Isoenzymen ermittelt haben (Kleiner et al., 2003). Vergleicht man diese Ergebnisse mit den hier errechneten IC_{50} -Werten für CYP1A1, so sind diese um mindestens eine Zehnerpotenz niedriger als die von Cai bzw. Kleiner et al. bestimmte Werte mit humanem CYP1A1.

Isopimpinellin inhibiert humanes CYP1A1 mit einem IC_{50} -Wert von 3,7 μM . Der IC_{50} in diesem System liegt auch hier höher als der in Mikrosomen der Ratte ermittelte, ungefähr um das 3 bzw. 250fache (Kleiner et al., 2003).

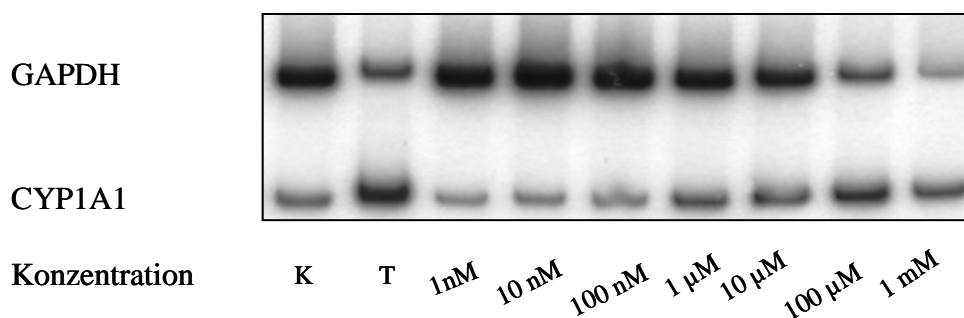
Eine höhere Selektivität von Bergamottin und Isopimpinellin bezüglich der CYP1A1 Inhibition im Vergleich zu anderen CYP-Isoenzymen und eine erhöhte Empfindlichkeit der Ratte im Vergleich zum Menschen in Bezug auf eine Hemmung von CYP1A1 kann aufgrund der unterschiedlichen Methodik, Spezies und der daraus resultierenden Varianz des Inhibitionsvermögens jedoch nicht abgeleitet werden.

3.1.2 Expressionsanalyse

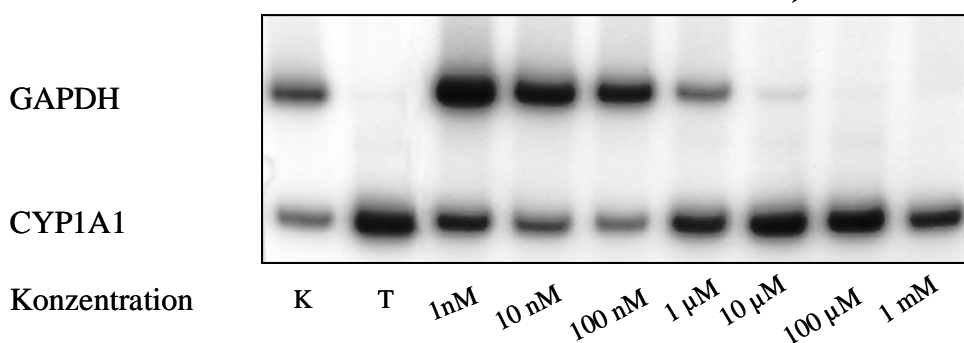
3.1.2.1 Expressionsanalyse mittels RT-PCR

Um eine mögliche Induktion der *CYP1A1* mRNA Expression nach 48 h Inkubation von Rattenhepatozyten in Primärkultur mit Furocumarinen nachzuweisen, wurde die RNA aus diesen Zellen isoliert und einer semiquantitativen RT-PCR unterworfen. Als interne Kontrolle wurde jeweils ein Fragment des *Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase* (GAPDH) Gens simultan koamplifiziert. Die Inkubation der Zellen fand in Anwesenheit von Licht statt. Als Vergleichskontrollen diente die gewonnene RNA aus DMSO- (K) und TCDD (T)-inkubierten Zellen.

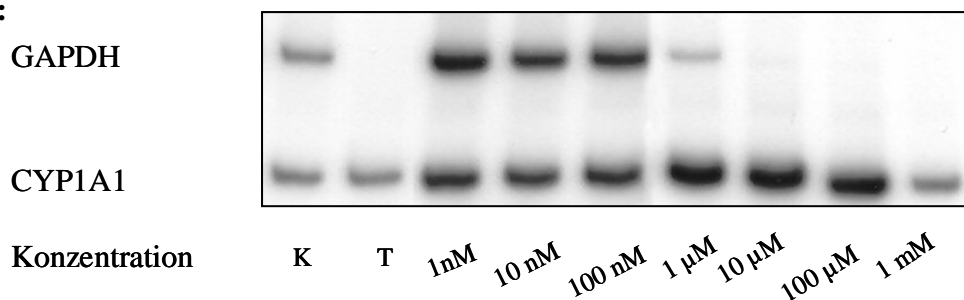
Angelicin:



Bergamottin:



Isopimpinellin:

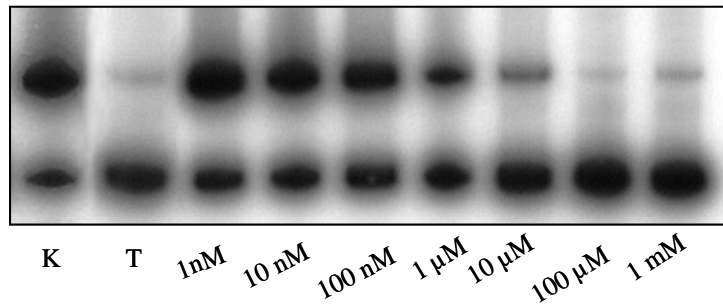


8-MOP:

GAPDH

CYP1A1

Konzentration

**Abbildung 3.5: repräsentative RT-PCR von Furocumarin inkubierten Primärhepatozyten bei Licht**

Die Röntgenfilme wurden mit Hilfe des Softwareprogramms TINA 2.09a (Raytest, Straubenhardt) densitometrisch ausgewertet. Die Normierung der CYP1A1-Expression erfolgte auf die entsprechende GAPDH-Werte. Die Expression der DMSO-Kontrolle wurde gleich 100% gesetzt.

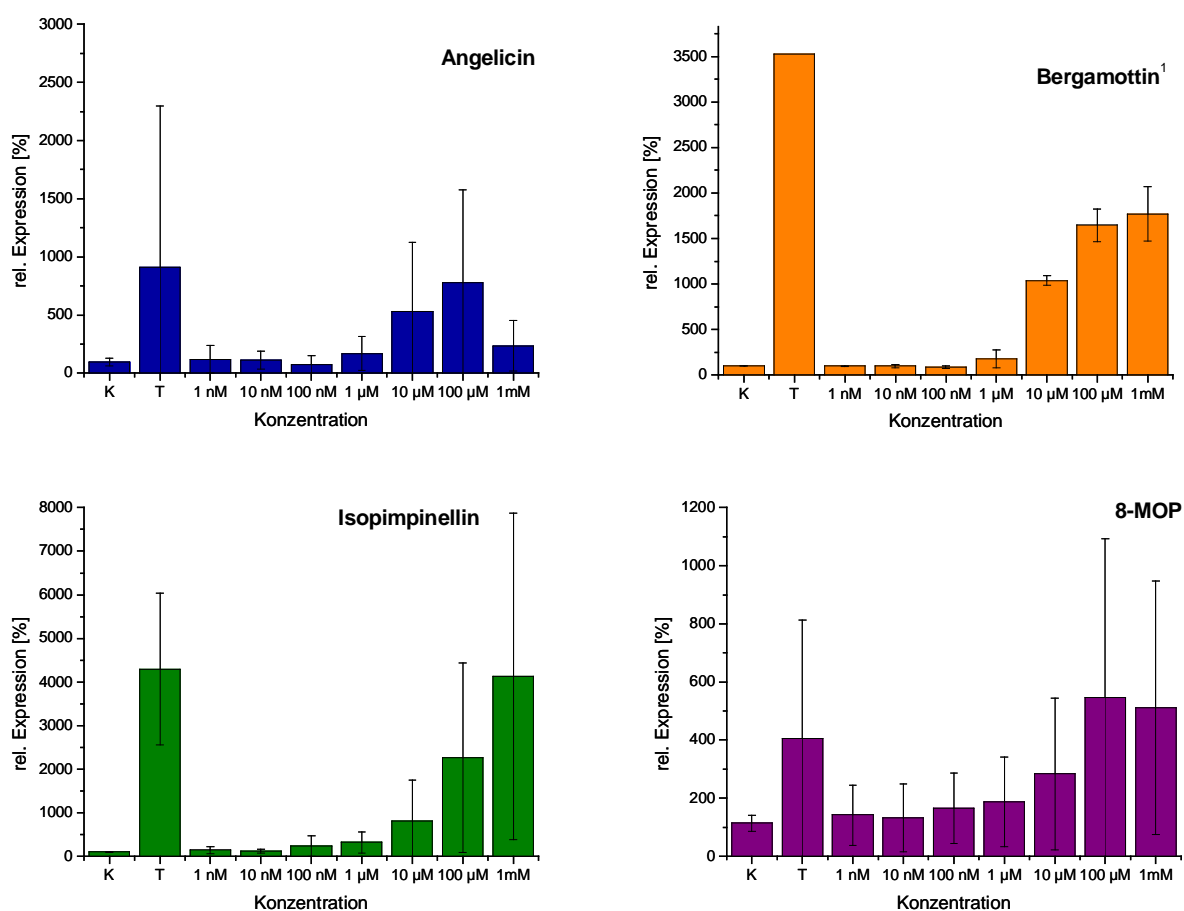


Abbildung 3.6: CYP1A1 mRNA Expression der RT-PCR von Furocumarin inkubierten Primärhepatozyten bei Licht, n=3; ¹ Daten aus n=2 bzw. n=1 (TCDD)

Wie in den Darstellungen der repräsentativen Röntgenfilme zu erkennen, ist eine mehr oder weniger stark ausgeprägte Induktion der CYP1A1 mRNA ausgelöst durch Furocumarine nach Inkubation der Zellen bei Licht zu erkennen. Die semiquantitative Auswertung erwies sich jedoch als schwierig, da die GAPDH-Banden sehr unterschiedlich in ihrer Intensität bzw. teilweise sehr schwach zu detektieren waren. Dadurch lassen sich auch die sehr hohen Schwankungsbreiten der Werte erklären. Der Grund hierfür scheint weder in variierenden Ausgangsgehalten und Qualität der mRNA noch in einer stark unterschiedlichen GAPDH Expression zu liegen, sondern vielmehr in der simultanen Bestimmung von CYP1A1 und GAPDH in einem Ansatz. Wird die Bande des CYP1A1 intensiver, wie bei TCDD erwartet, so ist die GAPDH schwächer als in vergleichbaren PCR-Ansätzen der selben RNA ohne CYP1A1-Bestimmung, was für eine Konkurrenzreaktion der PCR-Produkte spricht. Trotz zahlreicher Optimierungsexperimente der PCR-Bedingungen (Reaktionsmix, Annealing

Temperatur, PCR-Programm, etc.) konnte dieses Problem nicht vollständig gelöst werden. Die hier gewonnenen Daten zeigen eine durch Furocumarine ausgelöste CYP1A1 Induktion bei Licht, für eine exakte Quantifizierung dieses Effektes ist das angewandte Verfahren jedoch nicht geeignet. Daher wurde zusätzlich eine weitere Methode etabliert, um die Expression der CYP1A1 mRNA exakt bestimmen zu können.

3.1.2.2 Expressionsanalyse mittels real time PCR

Bei der real time PCR erfolgt die Erfassung der Produktbildung simultan während der Reaktion durch Fluoreszenzmessung und der des darüber ermittelten C_t -Wertes. Der C_t -Wert ist der Zyklus, bei dem die Amplifikationskurve den Fluoreszenzschwellenwert ('threshold') übersteigt. Für eine spätere relative Quantifizierung, d.h. das Verhältnis der C_t -Werte des Kandidatengens zum 'housekeeping' Gen, ist die Effizienz der PCR-Reaktion von entscheidender Bedeutung. Die Validierung der Primerpaare erfolgte wie in Abschnitt 2.2.12 beschrieben. Eine nach der Beendigung der PCR durchgeführte Schmelzpunktanalyse ermöglicht die Überprüfung der Spezifität der gebildeten Produkte. Die als Schmelzpunktpeaks dargestellten Ergebnisse zeigen durch Nebenprodukte wie Primerpaare und unspezifische Produkte verursachte Peaks durch eine Verschiebung in der Schmelztemperatur an.

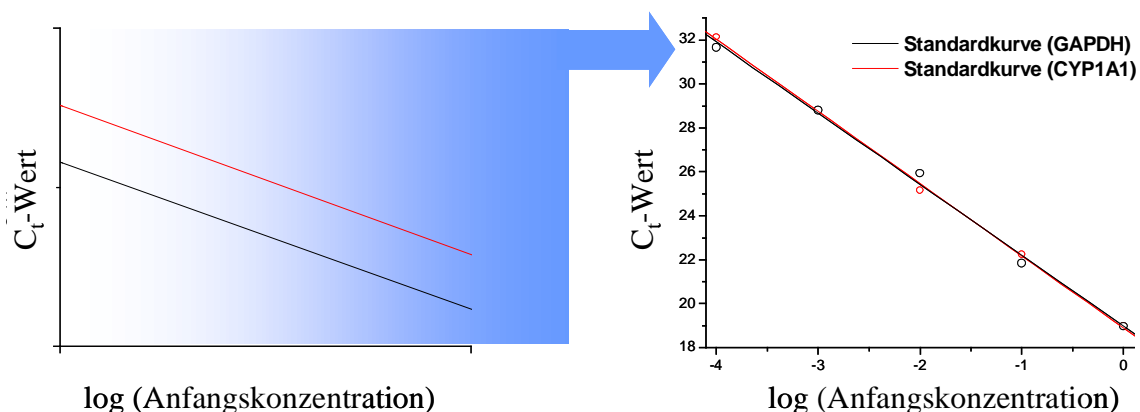


Abbildung 3.7: Validierung der Primer für die real time PCR

Bei der Schmelzkurvenanalyse konnten keine nennenswerten Nebenprodukte beobachtet werden. Die Primerpaare für CYP1A1 und das 'housekeeping' Gen GAPDH zeigen eine Effi-

zienz von 101,5 bzw. 103,8% und liegen damit im erwarteten Bereich (100%). Des Weiteren sind die Steigungen in der halblogarithmischen Darstellung der C_t -Werte annähernd parallel. Somit sind die hier gewählten Primer für eine quantitative Bestimmung der CYP1A1 Expression geeignet.

Die Primärhepatozyten wurden wie zuvor beschrieben mit unterschiedlichen Konzentrationen von Furocumarinen in Helligkeit und Dunkelheit inkubiert, die RNA aus $n=3$ unterschiedlichen Versuchsreihen isoliert und einer RT-Reaktion unterworfen. Die erhaltene cDNA wurde zur real time PCR-Reaktion eingesetzt. Versuchskontrollen waren auch hier DMSO und TCDD (T; 1 nM). Die Auswertung der gewonnenen Daten erfolgte über die $\Delta\Delta C_t$ -Methode.

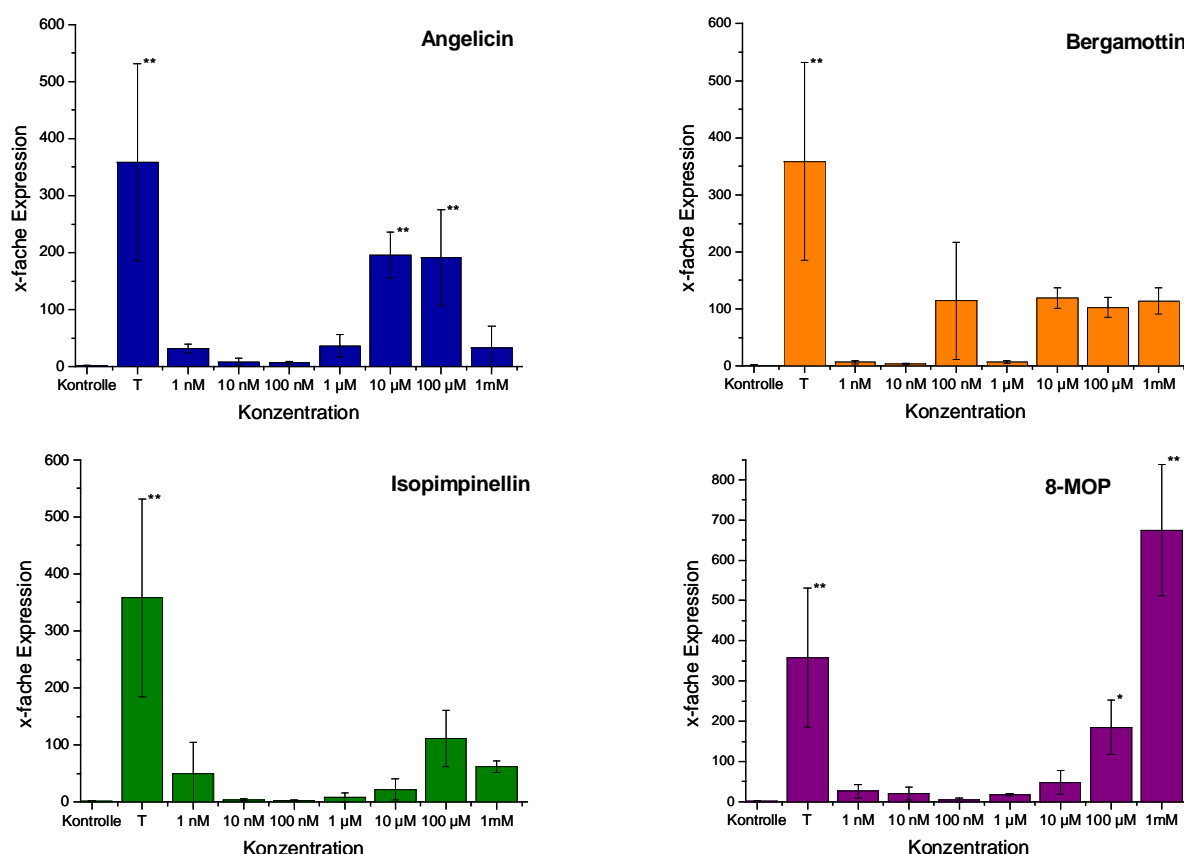


Abbildung 3.8: CYP1A1 mRNA Expression von Furocumarin inkubierten Rattenhepatozyten unter Lichteinfluss

Unter Lichteinfluss zeigt Angelicin eine signifikante Induktion der *CYP1A1* mRNA bei einer Konzentration von 10-100 µM. Auch 8-MOP ist ab einer Konzentration von etwa 100 µM in

der Lage, die CYP1A1 mRNA Expression statistisch signifikant zu steigern. Hierbei ist der Induktionseffekt bei der höchsten Konzentration größer als der von TCDD (1 nM). Bei Bergamottin und Isopimpinellin sind schwache induktive Effekte zu beobachten, allerdings sind diese nicht signifikant. Daher ist anzunehmen, dass aufgrund dieser Befunde zumindest Angelicin und 8-MOP potentielle AhR-Liganden sein könnten.

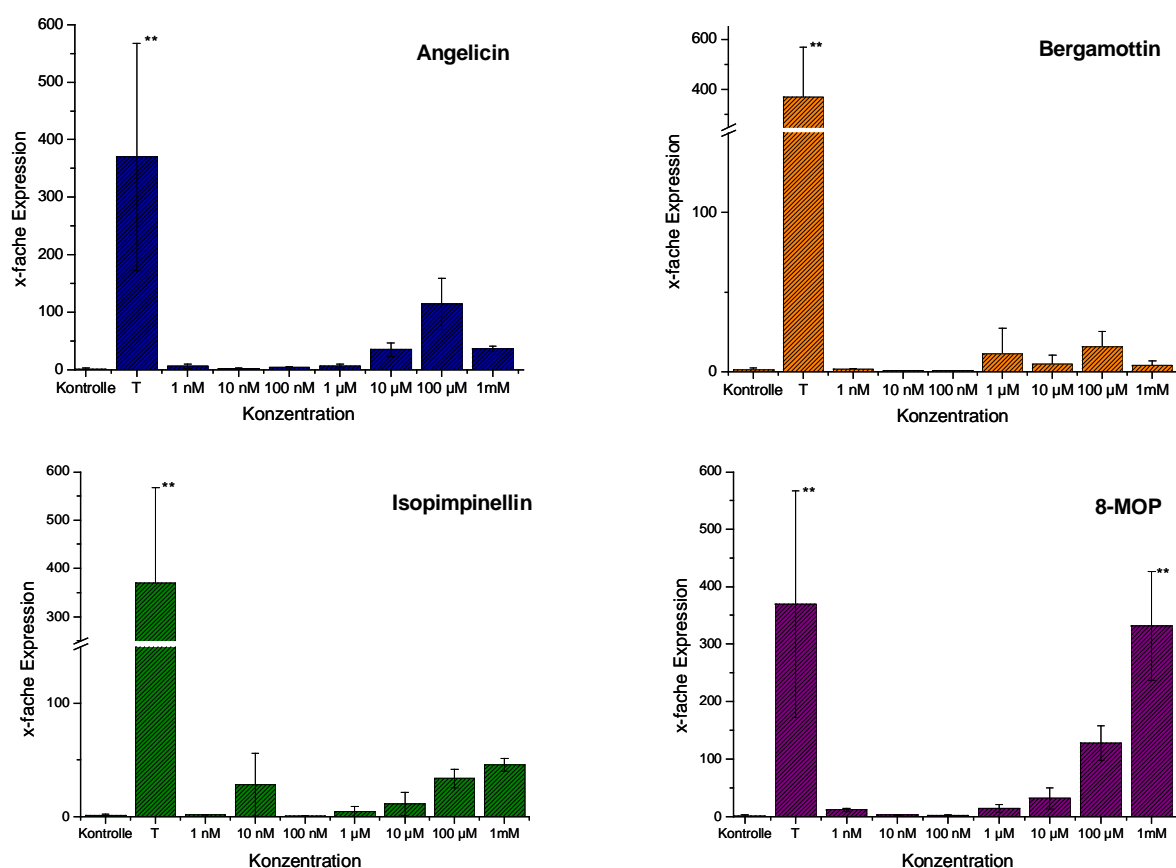


Abbildung 3.9: CYP1A1 mRNA Expression von Furocumarin inkubierten Rattenhepatozyten unter Lichtausschluss

8-MOP führt auch unter Lichtausschluss zu einer signifikanten *CYP1A1* mRNA Expressionssteigerung bei einer Konzentration von 1 mM. Alle anderen Substanzen zeigen nur eine schwache Induktion.

Dies entspricht Literaturdaten, in denen für 8-MOP ein zeitabhängiger induktiver Effekt auf *CYP1A1 in vivo* beschrieben wird (Bickers et al., 1982; Gwang 1996). Außerdem ist 8-MOP in der Lage, seine eigene Bioaktivierung zu stimulieren (Mays et al., 1990). Diese Daten für

sich gesehen sprechen für eine nur geringe transkriptionelle Aktivierung des CYP1A1 durch Furocumarine. Daher sollten die weiteren Untersuchungen in die Bewertung miteinbezogen werden.

3.1.3 Western-Blot-Analyse

Nach 48 h Inkubation der Primärhepatozyten unter definierten experimentellen Bedingungen wurde das Gesamtprotein isoliert und einer Western-Blot-Analyse mit CYP1A1 spezifischen Antikörpern unterzogen. Als Kontrolle dienten DMSO (K) und TCDD (T; 1 nM). Im Nachfolgenden ist für jede Substanz je ein repräsentativer Blot dargestellt, wobei die Inkubation unter Lichteinfluss stattfand.

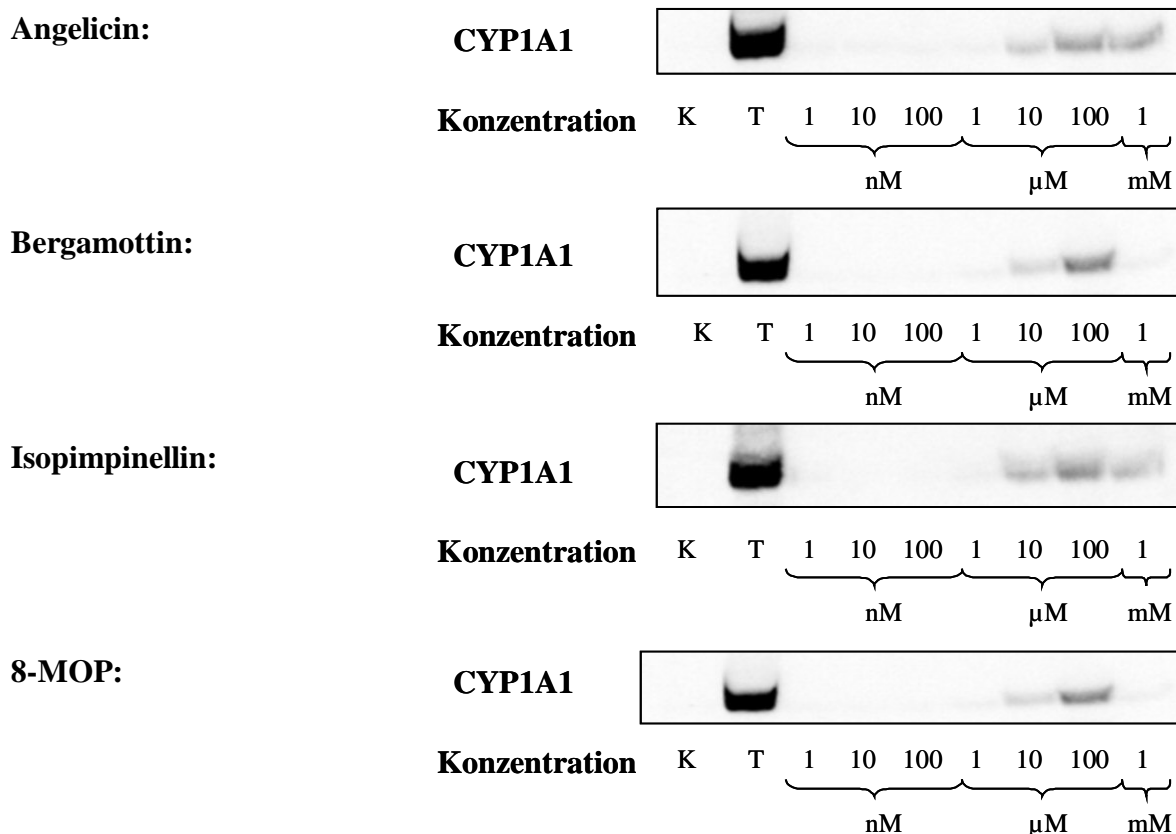


Abbildung 3.10: Western Blots mit Protein aus bei Licht mit Furocumarin inkubierten Primärhepatozyten

Die densitometrische Auswertung erfolgte mit der TINA 2.09a-Software (Raytest, Straubenhardt). Die Proteinexpression aus ≥ 3 unabhängigen Analysen wurde auf die DMSO-Kontrolle (100%) normiert.

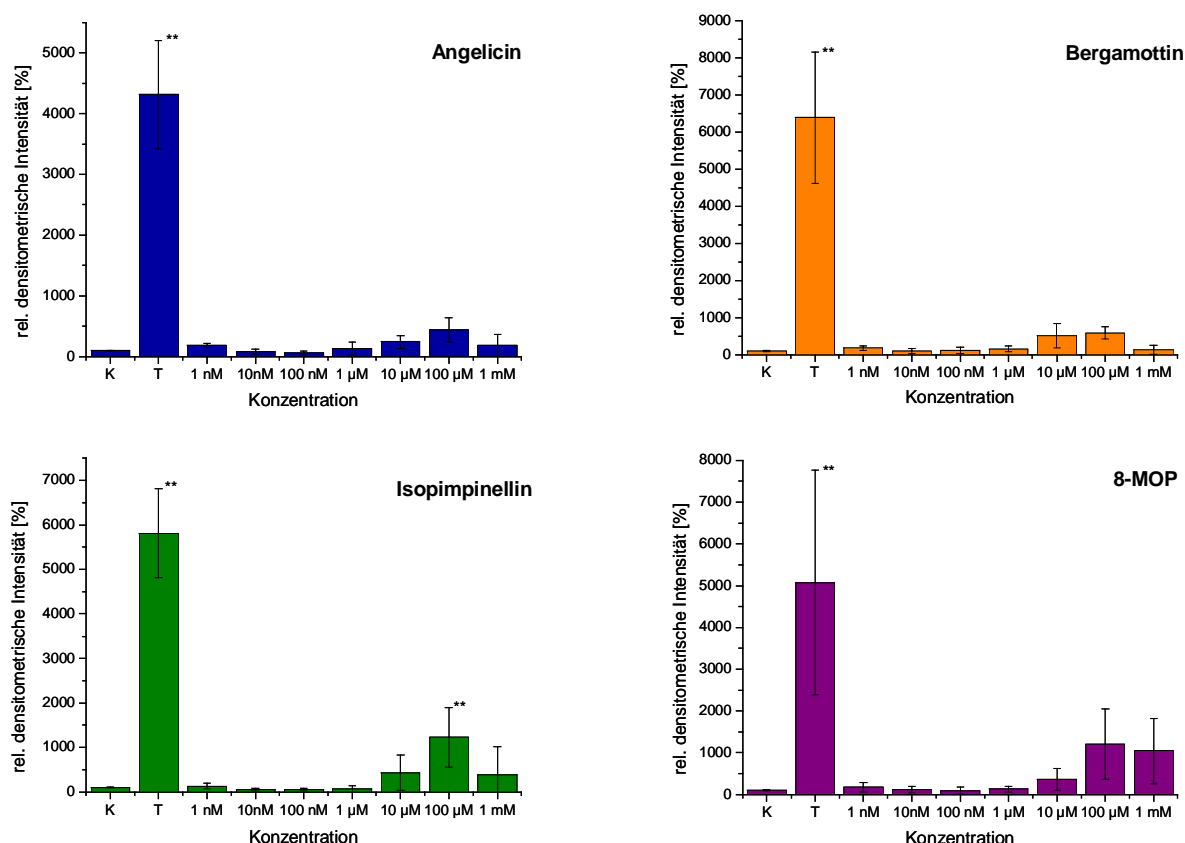


Abbildung 3.11: CYP1A1 Proteinexpression aus bei Licht mit Furocumarin inkubierten Primärhepatozyten

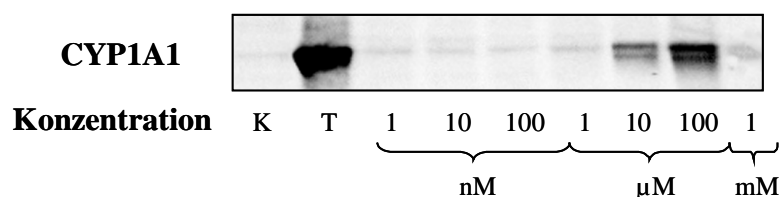
Außer für die Positivkontrolle TCDD ist nur bei Isopimpinellin bei 100 µM ein signifikanter induktiver Effekt zu beobachten. Alle Verbindungen sind ab einer Konzentration von ca. 10 µM schwache Induktoren für das CYP1A1 Protein bei Licht.

Ein schwach induktiver Effekt auf das CYP1A1 Protein wurde ebenfalls durch Wen et al. in humanen Hepatozyten nach 48 h Inkubation in Konzentrationen von 0,1-25 µM beschrieben (Wen et al., 2002). Die Experimente wurden nicht unter Lichtausschluss durchgeführt. Die Ergebnisse sind somit vergleichbar mit der hier zu beobachteten Induktion in einem Bereich von 1-100 µM in Rattenhepatozyten.

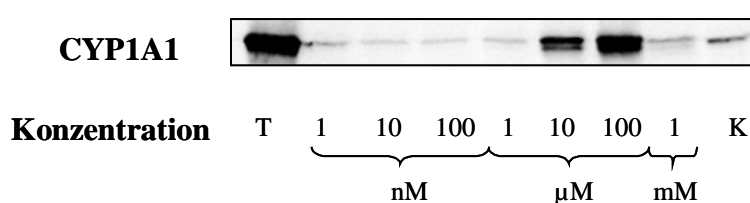
Diese Beobachtung korreliert mit der CYP1A1 mRNA Expression, wobei auffallend ist, dass die Konzentrationen für die RNA- und Proteininduktion im selben Bereich liegen. Allerdings ist der Induktionseffekt auf Proteinebene sehr viel schwächer ausgeprägt als auf RNA-Ebene. Es ist davon auszugehen, dass aufgrund der inhibitorischen Fähigkeiten der Furocumarine nur noch ein gewisser Anteil an immunochemisch reaktiven CYP1A1 Protein vorhanden ist, während ein Großteil des Enzyms bereits degradiert oder inaktiviert ist und damit nicht mehr detektiert werden kann. Des Weiteren spielt der Zeitverlauf der transkriptionellen Aktivierung eine entscheidende Rolle für die Bewertung dieser Ergebnisse, d.h. möglicherweise entspricht der Erntezeitpunkt nach 48 h nicht dem Zeitpunkt der maximalen Proteinexpression.

Wird die CYP1A1 Proteinexpression von Zellen, die in Abwesenheit von Licht inkubiert wurden, untersucht, so zeigt sich ein etwas anderes Bild.

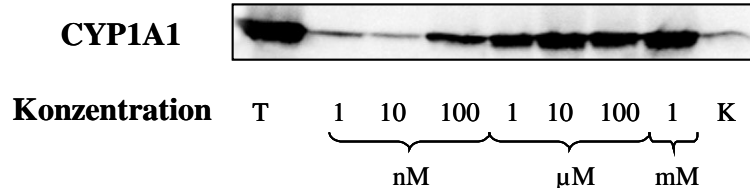
Angelicin:



Bergamottin:



Isopimpinellin:



8-MOP:

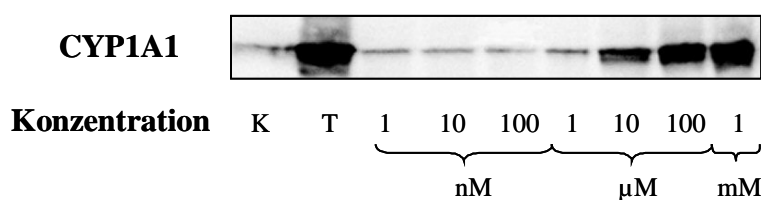


Abbildung 3.12: Western Blots mit Protein aus bei Licht mit Furocumarin inkubierten Primärhepatozyten

Die densitometrische Analyse wurde analog der vorhergehenden Experimente unter Licht durchgeführt. Die Schwankungen in der relativen densitometrischen Intensität der Experimente bei unterschiedlichen Lichtverhältnissen rühren von individuellen Versuchsansätzen und dem Detektionsverfahren (Belichtungszeit, etc.) her.

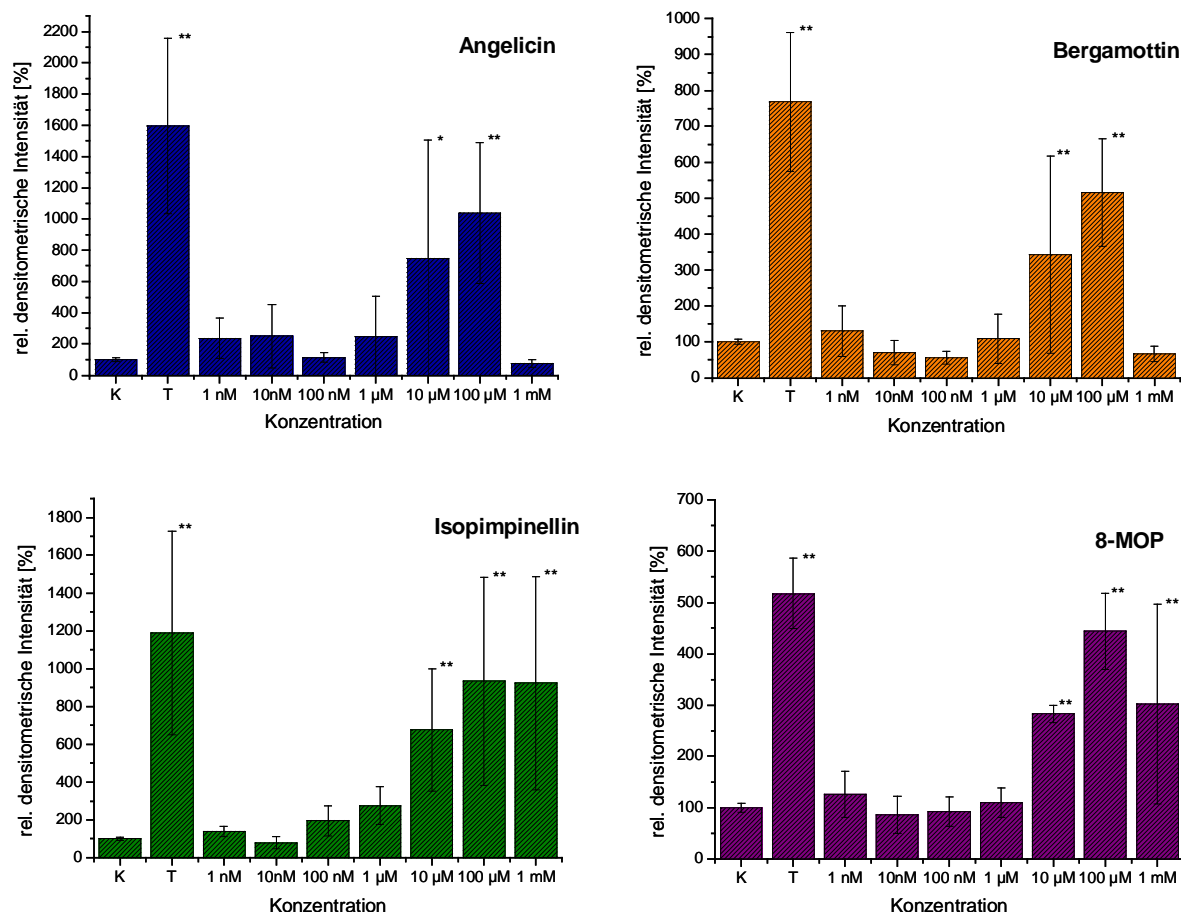


Abbildung 3.13: CYP1A1 Proteinexpression aus bei Lichtausschluss mit Furocumarin inkubierten Primärhepatozyten

Alle Furocumarine induzieren die Proteinexpression nach Inkubation im Dunkeln ab einer Konzentration von etwa 1-10 μM . Die Stärke der Induktion liegt für alle Substanzen in Rahmen der TCDD Kontrolle.

Hier korreliert das Ergebnis auf den ersten Blick nicht mit den mRNA-Werten, die zumindest in diesem Konzentrationsbereich nur auf eine schwache Induktion der CYP1A1-Expression hindeuten.

Auffallend ist sowohl bei der Analyse der mRNA- als auch der Proteinexpression, dass für einige Substanzen wie Angelicin und Bergamottin ein starker Abfall der mRNA-Expression bzw. des Proteingehaltes in der höchsten Konzentration (1mM) beobachtet werden konnte. Dies kann teilweise auf das Lösungsverhalten unabhängig von den Lichtverhältnissen zurückgeführt werden. Isopimpinellin, Angelicin und 8-MOP fallen in den höchsten Konzentrationen im Zellkulturmedium aus und gehen auch bei der nachfolgenden Inkubation bei 37°C nicht mehr vollständig in Lösung.

Zusammenfassend ist hier ein deutlicher induktiver Effekt der Furocumarine in Dunkelheit zu sehen, was auf die Aktivierung des AhR-Signalweges schließen lässt.

3.1.4 Reportergenuntersuchungen

H4IIE-Zellen wurden wie in Material und Methoden beschrieben kultiviert und mit dem XRE abhängigen Reportergenplasmid pGL3-XRE und Kontrollplasmid mittels Kalziumphosphatmethode transient transfiziert. Die Zellen wurden nachfolgend für 48 h mit den Furocumارين in einer Konzentration von 100 µM unter definierten Bedingungen inkubiert. Nach lumimetrischer Bestimmung der Luciferase-Aktivitäten für das Reportergen- und Kontrollplasmid wurde die relative Reportergenaktivität in Bezug auf die DMSO-Kontrolle (100%) ermittelt. Als Positivkontrolle fungierte TCDD (T; 1 nM). Die Aktivität des pGL3-Promotorplasmids ohne Insert wurde ebenfalls getestet und lag im Bereich von unbehandelten Zellen. Es wurden $n \geq 5$ unabhängige Messreihen durchgeführt.

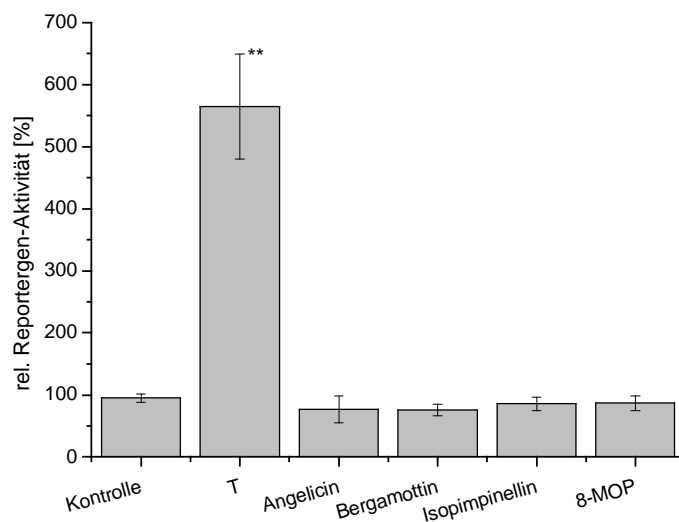


Abbildung 3.14: Reporter-Gen-Aktivität des pGL3-XRE in H4IIE-Zellen nach Behandlung mit 100 μ M Furocumarin unter Licht; T:TCDD (1 nM)

Keines der Furocumarine zeigte bei Lichtinkubation eine signifikante Veränderung der Reporter-Gen-Aktivität, während TCDD eine deutliche Induktion aufwies.

Dies korreliert mit der Western Blot Analyse, wo nur eine leichte nicht signifikante Induktion der CYP1A1 Proteinexpression gezeigt werden konnte.

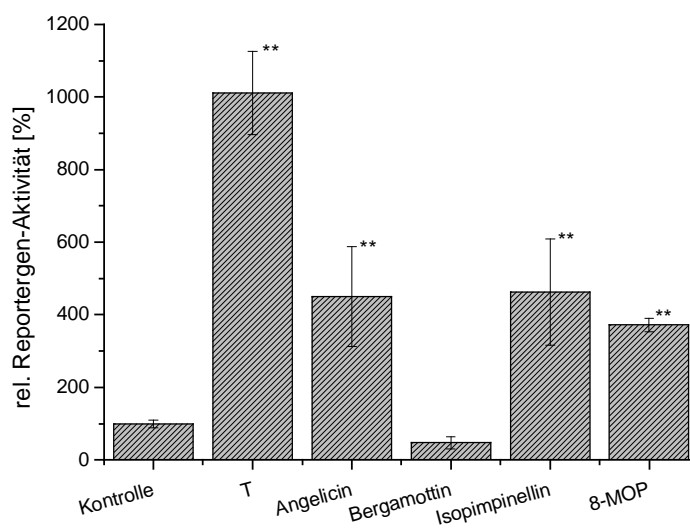


Abbildung 3.15: Reporter-genaktivität des pGL3-XRE in H4IIE-Zellen nach Behandlung mit 100 μ M Furocumarin unter Lichtausschluss; T: TCDD (1 nM)

Lichtausschluss bei der Inkubation transfizierter Zellen führt zu einer signifikanten Induktion der Reporter-genaktivität bei Angelicin, Isopimpinellin und 8-MOP, während Bergamottin eher einen leicht inhibierenden Effekt zeigte. Die Aktivierung lag ungefähr bei 40-50 % der TCDD Kontrolle.

Angelicin, Isopimpinellin und 8-MOP sind bei Dunkelheit in einer Konzentration von 100 μ M AhR-Agonisten und somit in der Lage, eine Bindung des aktiven AhR-Komplexes an das XRE hervorzurufen. Der Verlust der agonistischen AhR-Bindung unter Lichteinfluss könnte auf eine von UV-Strahlung geförderte kovalente Bindung von Furocumarinen an Makromolekülen zurückzuführen sein. Dabei könnte es zu Interaktionen der Furocumarine mit den Multiproteinkomplexen der AhR, des aktivierten AhR/ARNT-Komplexes und dessen DNA-Interaktionen kommen. Auch eine Komplexierung mit ARNT wäre denkbar, die einen aktiven AhR verhindert. Die Aktivierung des AhRR durch Furocumarinbindung könnte ebenfalls zu einer transkriptionellen Inaktivierung führen.

Insekten wie der *Papilio polyxenes* weisen ein XRE-ähnliches Element im Promotor des *CYP6B1* auf, welches in der Lage ist Furocumarine zu metabolisieren (Hung et al., 1996; Petersen et al., 2003).

Jeong et al. fanden in Gelshiftexperimenten eine Inhibition der Bindung des aktiven AhR an das XRE durch 8-MOP (Jeong et al., 1995). Da diese Studien nicht unter Lichtausschluss durchgeführt wurden, verdeutlichen sie ebenfalls die Möglichkeit mancher Furocumarine zentrale Stellen des AhR-Signaltransduktionsweges zu blockieren und auch eine von ihnen selbst hervorgerufene Aktivierung des AhR durch den photoaktivierten Anteil an Verbindung in Hinblick auf die XRE-Bindung zu hemmen.

Bergamottin ist bei allen Reportergenuntersuchungen inaktiv in Bezug auf eine AhR-Ligandbindung. Die aliphatische Seitenkette scheint einen maßgeblichen Einfluss auf die AhR-Bindungsfähigkeit dieses Furocumarins zu haben. Der erhöhte CYP1A1 Proteingehalt in Abwesenheit von Licht verläuft somit nicht über eine AhR-vermittelte transkriptionelle Aktivierung des CYP1A1.

Aufgrund der Daten dieser Arbeit kann von einer AhR-vermittelten Induktion des CYP1A1 durch Angelicin, Isopimpinellin und 8-MOP bei Dunkelheit ausgegangen werden, was eine deutliche Steigerung der Proteinexpression zur Folge hat.

3.1.5 Gelshiftexperimente

Zum Nachweis der Aktivierung des AhR durch die hier untersuchten Furocumarine wurden EMSAs durchgeführt. Hierbei kann über die veränderten Laufeigenschaften von Protein/DNA-Komplexen eine Bindung von Proteinen an definierte DNA-Sequenzen nachgewiesen werden.

Nach Inkubation von H4IIE-Zellen mit Furocumarinen unter Licht wurden aus den Zellen Kernextrakte gewonnen und diese einem Gelshift unterworfen. Als Positivkontrolle diente TCDD (1 nM).

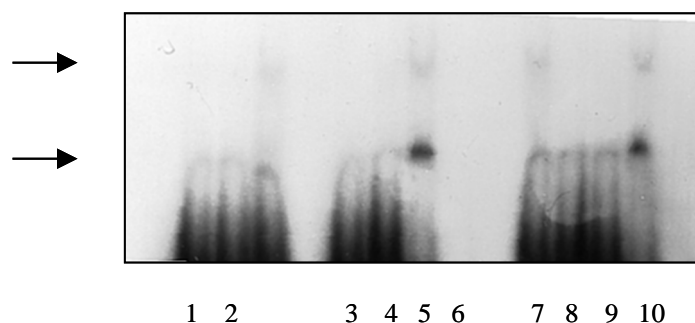


Abbildung 3.16: EMSA mit Kernextrakt aus Furocumarin (100 μ M) inkubierten H4IIE-Zellen; 1: Negativkontrolle ohne Kernextrakt; 2: DMSO-Kontrolle; 5,7 und 10: Positivkontrolle TCDD (1 nM); 3: 8-MOP; 4: Angelicin; 6: Hemmkontrolle mit Überschuss an unmarkierter Sonde; 8: Isopimpinellin; 9: Bergamottin

Die mit Furocumarinen behandelten Zellen zeigen bei Licht keine nennenswerte Affinität eines nukleären AhR-Komplexes an das XRE-Element, während TCDD zu deutlichen Banden führt (Abbildung 1.16: Pfeile). Sie sind damit unter diesen Bedingungen keine AhR-Liganden. Dies stimmt mit den in Reporter-genuntersuchungen gefundenen Ergebnissen überein, die keine Induktion der Luciferaseaktivität durch die vier Furocumarine zeigten.

Aufgrund des großen Optimierungsaufwandes dieser Methode wurde auf weitere Untersuchungen (z.B. unter anderen Lichtverhältnissen) zugunsten der zuvor dargestellten Reporter-genexperimente verzichtet.

3.1.6 Zytotoxizität

Die Bestimmung der Zytotoxizität erfolgte mit dem LDH-Assay. Primäre Hepatozyten der Ratte wurden für 48 h mit den Testsubstanzen inkubiert und danach wie in Material und Methoden beschrieben aufgearbeitet und die LDH-Aktivität in Medium und Zellsuspension bestimmt. Das Verhältnis dieser Aktivitäten zueinander ist ein Maß für die Zellschädigung. Saponin in einer Konzentration von 1% diente als Positivkontrolle, während DMSO behandelte Zellen als Negativreferenz herangezogen wurden. Es wurden $n \geq 3$ unabhängige Messreihen untersucht.

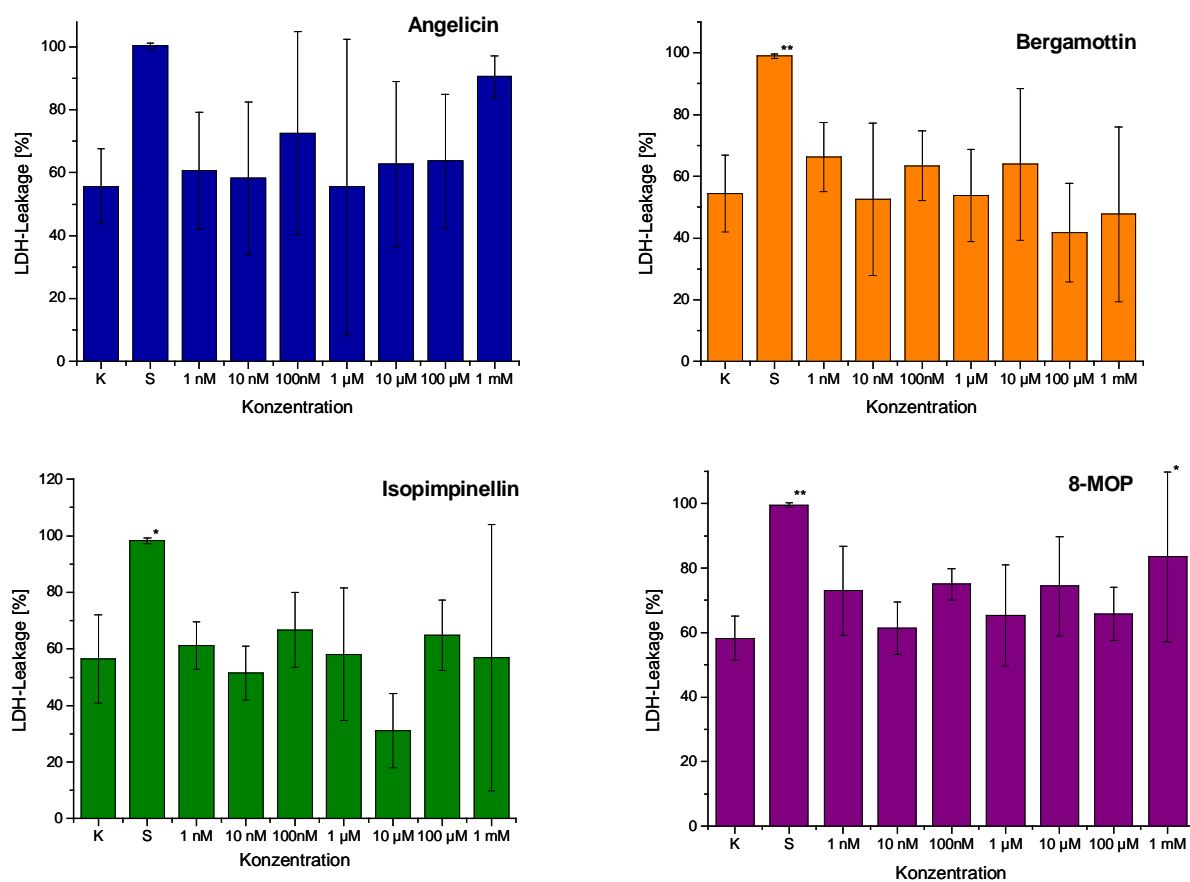


Abbildung 3.17: LDH-Leakage von mit Furocumarin inkubierten Rattenhepatozyten

Keine der Substanzen zeigte eine statistisch signifikante erhöhte LDH-Leakage und damit Zytotoxizität im Vergleich zu DMSO mit Ausnahme von 8-MOP in einer Konzentration von 1 mM.

Ein Grund für die auftretende Zellschädigung könnte in der schlechten Löslichkeit des 8-MOP im Zellmedium bei dieser Konzentration liegen. 8-MOP fällt aus und haftet dann auf den Zellen, die dadurch möglicherweise absterben.

Eine weitere Ursache könnte auch eine kurzzeitige sehr hohe Induktion des CYP1A1 sein, was über verschiedene Mechanismen (u.a. ROS-Generierung) zu einer Zellschädigung und damit verbundenen erhöhten Freisetzung von LDH führen könnte. Dies spiegelt sich auch in der sehr hohen *CYP1A1* mRNA Induktion von 8-MOP bei dieser Konzentration wider.

Die Standardabweichungen der LDH-Leakage sind teilweise hoch, was für einen relativ starken Einfluss der Qualität der Rattenhepatozyten aus der Perfusion spricht. Des Weiteren sind individuelle Unterschiede der einzelnen verwendeten Tiere in ihrer Empfindlichkeit von Bedeutung.

3.1.7 6',7'-Dihydroxybergamottin

Wie zuvor erwähnt, konnten aufgrund der geringen zur Verfügung stehenden Menge an DHB nur einige Untersuchungen durchgeführt werden. DHB ist ein potenter Inhibitor von CYP3A4 und kommt in Grapefruitsaft vor. Der IC_{50} -Wert in humanen Lebermikrosomen liegt abhängig von der Methodik zwischen 0,3 und 0,65 μ M bzw. bei etwa 2 μ M. (Edwards et al., 1999; Guo et al., 2000; Tassaneeyakul et al., 2000)

3.1.7.1 Western Blot Analyse

Die Untersuchung der CYP1A1 Proteinexpression erfolgte analog der Bestimmung für die Inkubation mit den anderen Furocumarinen in Rattenhepatozyten in Primärkultur, allerdings wurde hierbei DHB nur in einer Konzentration von 100 μ M eingesetzt. DMSO (K) und TCDD (T; 1 nM) behandelte Zellen dienten als Kontrollen.

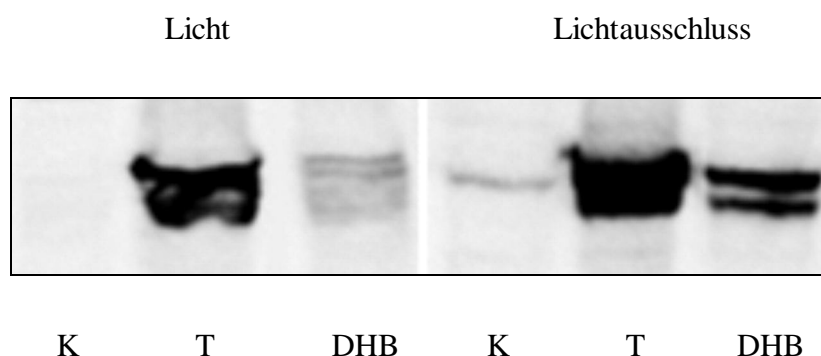


Abbildung 3.18: Western Blots mit Gesamthomogenat aus DHB (100 μ M) inkubierten Primärhepatozyten bei unterschiedlichen Lichtverhältnissen; K: DMSO-Kontrolle; T: TCDD (1 nM)

DHB verhält sich analog zu den anderen untersuchten Furocumarinen. Es zeigt eine schwache Erhöhung an CYP1A1 Protein unter Lichteinfluss und einen deutlich stärkeren induktiven Effekt bei Dunkelheit.

3.1.7.2 Reportergenuntersuchungen

Auch hier wurden die Experimente wie zuvor beschrieben durchgeführt. Die Daten wurden in $n \geq 3$ unabhängigen Versuchsreihen ermittelt.

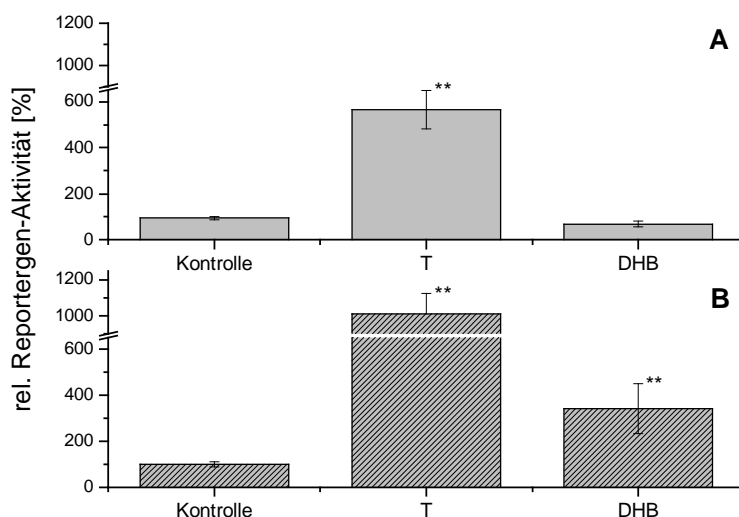


Abbildung 3.19: Reportergenaktivität des pGL3-XRE in H4IIE-Zellen nach Behandlung mit 100 μ M DHB unter Lichtausschluss; DMSO: Kontrolle; T: TCDD (1 nM); A: Inkubation der Zellen bei Licht; B: Inkubation der Zellen unter Lichtausschluss

Auch hier verhält sich DHB analog zu Angelicin, Isopimpinellin und 8-MOP und zeigt unter Lichtausschluss eine signifikante Induktion der Reportergenaktivität, während es bei Licht inaktiv ist.

Hier ist ein maßgeblicher Einfluss der beiden Hydroxysubstituenten auf das AhR-Bindungspotential zu erkennen, da Bergamottin im Gegensatz zu DHB völlig inaktiv als AhR-Ligand ist. Offenbar ermöglichen diese Substituenten trotz der räumlich sperrigen Seitenkette des Bergamottin eine Interaktion mit der Ligandbindungsdomäne des AhR.

Dies korreliert auch mit der hier detektierten gesteigerten CYP1A1 Proteinexpression unter Lichtausschluss. Daher ist anzunehmen, dass DHB ein vergleichbares Verhalten wie Angelicin, Isopimpinellin und 8-MOP aufweist, obwohl durch die strukturelle Ähnlichkeit eher ein dem Bergamottin analoges Wirkungsspektrum zu erwarten gewesen wäre.

Untersuchungen zum inhibitorischen Potential der Verbindung konnten aus den oben genannten Gründen nicht durchgeführt werden, würden aber sicherlich zu interessanten Erkenntnissen führen und sollten daher aufgrund der hier ermittelten Ergebnisse nachgeholt werden.

3.1.8 Inhibition der Topoisomerase-Aktivität durch Furocumarine

3.1.8.1 Topoisomerase I

Die Bestimmung der Aktivität der Topoisomerase I erfolgte mittels Relaxations-Assay wie in Material und Methoden beschrieben. Ein superspiralisiertes Plasmid (pUC18) wird durch die Topoisomerase I relaxiert. Potentielle Inhibitoren blockieren diesen Vorgang. Die Inkubation mit den Furocumarinen erfolgte auch hier unter definierten Lichtverhältnissen. Die resultierenden unterschiedlichen DNA-Formen wurden elektrophoretisch aufgetrennt und nach Ethidiumbromidfärbung detektiert. Die untere Bande (Spur 1) zeigt die superspiralisierte DNA, während die obere Bande die entspannte DNA darstellt.

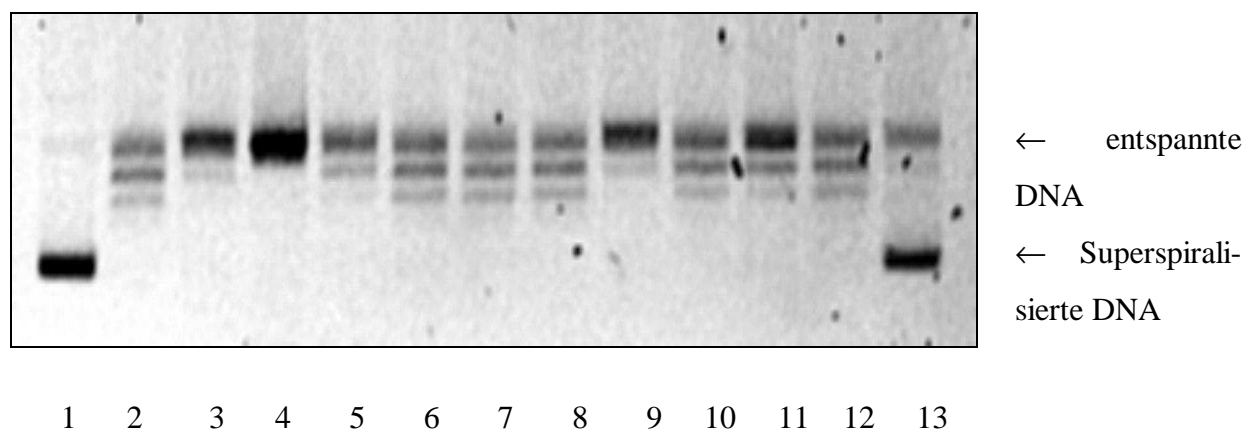


Abbildung 3.20: Inhibition der Topoisomerase I Aktivität bei Licht; 1: Negativkontrolle; 2: DMSO-Kontrolle; 3: 8-MOP (100 µM); 4: 8-MOP (10 µM); 5: Angelicin (100 µM); 6: Angelicin (10 µM); 7: Bergamottin (100 µM); 8: Bergamottin (10 µM); 9: Isopimpinellin (100 µM); 10: Isopimpinellin (10 µM); 11: DHB (100 µM); 12: DHB (10 µM); 13: Positivkontrolle Camptothecin (10 µM)

Unter Lichteinfluss zeigt keines der Furocumarine in Konzentrationen von 10 und 100 µM eine deutliche Hemmung der Topoisomerase I Aktivität. Bei Wiederholungen des Experiments traten jedoch bei Bergamottin und 8-MOP Bandenverbreiterungen auf, die nicht zu erklären waren. Da dies eventuell auf die lichtabhängige Reaktivität der Furocumarine zu-

rückzuführen war, wurden weitere Untersuchungen unter variierten Belichtungsverhältnissen durchgeführt.

Im Nachfolgenden erfolgte die Herstellung der Probenansätze unter Rotlicht und die Inkubation mit den Testsubstanzen in Dunkelheit, für 15 min bei Tageslicht oder bei 15minütiger UV-Bestrahlung (254 nm). Bei einem Teil der Ansätze wurde das Plasmid außerdem erst nach Lichteinfluss zugegeben, um zu ermitteln, ob dies möglicherweise eine Hemmwirkung beeinflusst.

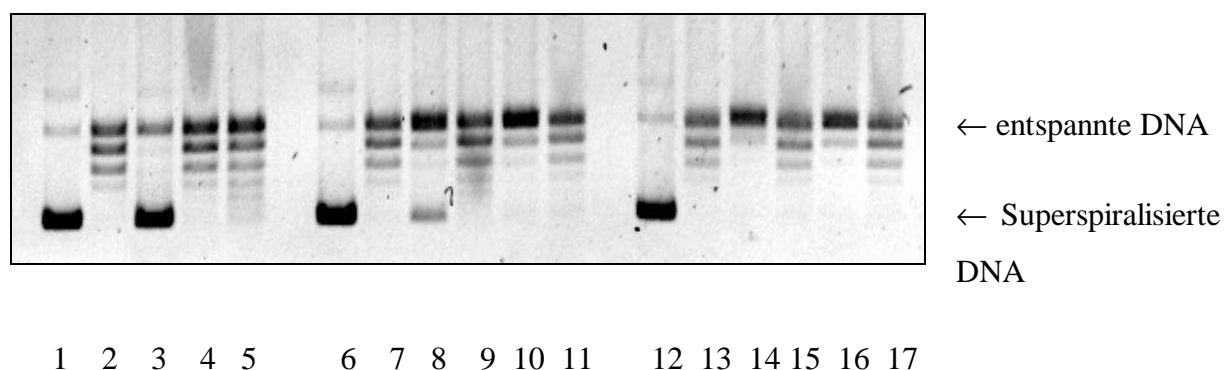


Abbildung 3.21: Inhibition der Topoisomerase I Aktivität bei unterschiedlichen Lichtverhältnissen; 1-5: Lichtausschluss; 6-11: 15 min Tageslicht; 12-17: 15 min UV-Bestrahlung; 1,6 und 12: Negativkontrolle; 2: Kontrolle mit Kernextrakt; 5, 7 und 13: DMSO-Kontrolle; 3,8,10,14 und 16: 8-MOP (100 μ M); 4,9,11,15 und 17: Bergamottin (100 μ M); bei 10,11,16 und 17: Zugabe des Plasmids nach Lichtinkubation

Bergamottin zeigt keine Hemmung der Topoisomerase I Aktivität in Abhängigkeit von der Lichteinwirkung.

8-MOP ist in einer Konzentration von 100 μ M bei Dunkelheit ein guter Inhibitor der Topoisomerase I vermittelten Relaxation, wobei seine Hemmwirkung mit zunehmender Exposition von Licht abnimmt und unter UV-Bestrahlung nicht mehr vorhanden ist. Zugabe des Plasmids nach Lichteinwirkung (Spur 10) verhindert den noch teilweise auftretenden Hemmeffekt von 8-MOP (Spur 8). Dies lässt darauf schließen, dass die inhibitorische Wirkung durch Photoaktivierung des 8-MOP verloren geht. Der UV-Anteil im Tageslicht scheint bereits zu genügen, um eine Reduktion der Topoisomerase I Hemmung zu verursachen.

Inwieweit die Inhibition unter Lichtausschluss durch 8-MOP von der Konzentration abhängt, wurde im Nachfolgenden untersucht und in n=3 unabhängigen Versuchsreihen bestätigt.

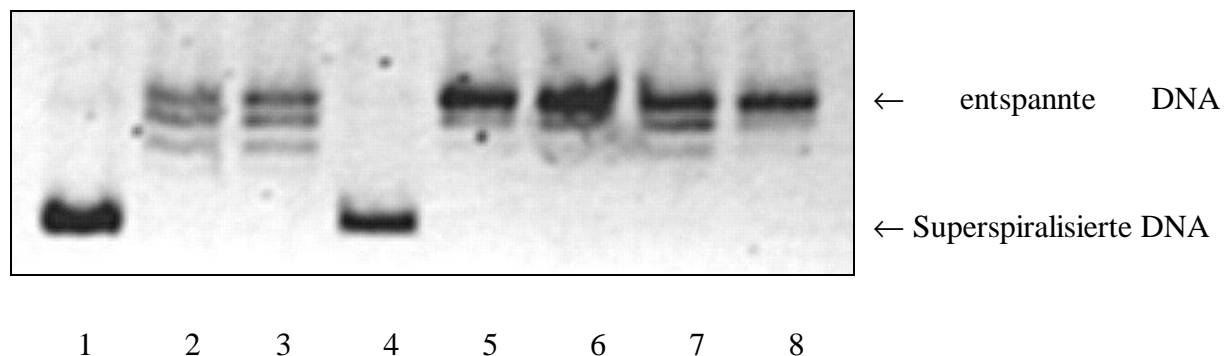


Abbildung 3.22: Inhibition der Topoisomerase I Aktivität durch 8-MOP unter Lichtausschluss; 1: Negativkontrolle; 2: Kontrolle mit Kernextrakt; 3: DMSO-Kontrolle; 4: 8-MOP (100 µM); 5: 8-MOP (75 µM); 6: 8-MOP (50 µM); 7: 8-MOP (25 µM); 8: 8-MOP (10 µM)

Die Inhibition der Relaxation tritt nur bei einer 8-MOP-Konzentration von 100 µM auf. Bereits ab 75 µM ist kein Effekt mehr detektierbar.

Der Hemmeffekt von 8-MOP ist sehr stark vom Lichteinfluss auf die Substanz und die Versuchsansätze abhängig. In lichtdurchlässigen Gefäßen gelagerte 8-MOP-Lösung zeigt unter den genannten Versuchsbedingungen keine Inhibition mehr, was mit den zuvor gefundenen Ergebnissen für die postinkubatorische Zugabe der Plasmid DNA übereinstimmt.

8-MOP ist unter Lichtausschluss in der Lage in die DNA zu interkalieren und nicht kovalente Komplexe zu bilden, während Lichtaktivierung eher zu kovalenten Bindungen mit Makromolekülen wie der DNA führt (Caffieri, 2001; Dall'Acqua et al., 1978). Diese Anlagerung an die DNA könnte eine mögliche Erklärung für das inhibitorische Potential des 8-MOP sein. Über welchen Mechanismus die Hemmung verläuft (Stabilisierung des 'Cleavable Complex', Hemmung der DNA-Bindung, etc.) ist bisher nicht bekannt. (Bailly, 2000; Lopez-Lazaro et al., 2002)

3.1.8.2 Topoisomerase II

Die Bestimmung der Topoisomerase II Aktivität erfolgte über die Entwirrung von Kinetoplasten DNA, die aus vernetzten Minizirkeln besteht. Hierbei werden getrennte Ansätze für die beiden Topoisomerase II Isoformen α und β untersucht. Die experimentelle Durchführung erfolgte bei normalem Tageslicht. Die Ergebnisse waren gut reproduzierbar und wurden in $n \geq 3$ unabhängigen Versuchsreihen bestätigt.

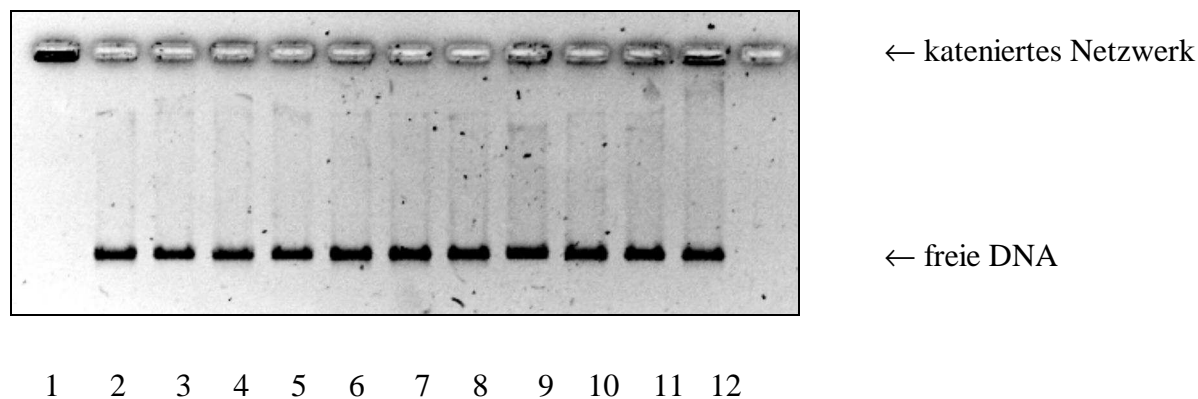


Abbildung 3.23: Inhibition der Topoisomerase II α Aktivität; 1: Negativkontrolle; 2: DMSO-Kontrolle; 3: 8-MOP (100 μ M); 4: 8-MOP (10 μ M); 5: Angelicin (100 μ M); 6: Angelicin (10 μ M); 7: Bergamottin (100 μ M); 8: Bergamottin (10 μ M); 9: Isopimpinellin (100 μ M); 10: Isopimpinellin (10 μ M); 11: DHB (100 μ M); 12: DHB (10 μ M)

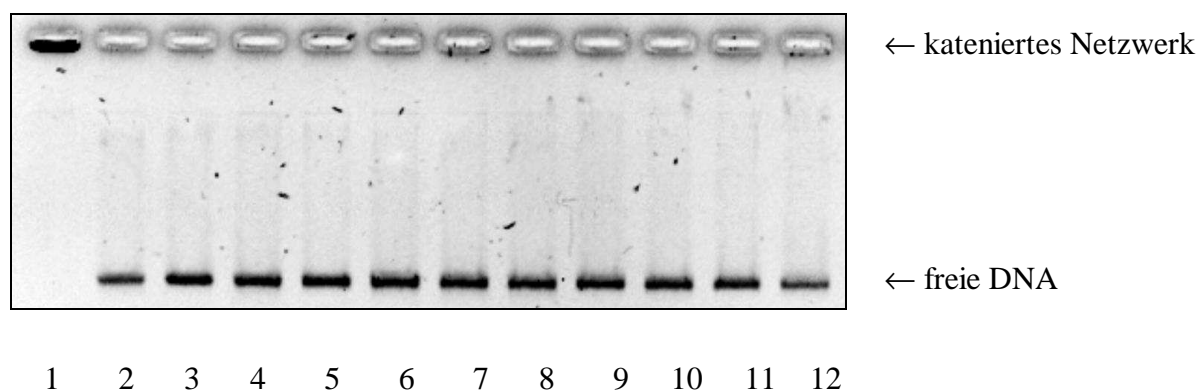


Abbildung 3.24: : Inhibition der Topoisomerase II β Aktivität; 1: Negativkontrolle; 2: DMSO-Kontrolle; 3: 8-MOP (100 μ M); 4: 8-MOP (10 μ M); 5: Angelicin (100 μ M); 6: Angelicin (10 μ M); 7: Bergamottin (100 μ M); 8: Bergamottin (10 μ M); 9: Isopimpinellin (100 μ M); 10: Isopimpinellin (10 μ M); 11: DHB (100 μ M); 12: DHB (10 μ M)

Weder auf die Topoisomerase II α noch auf die II β Aktivität ist eine Wirkung zu beobachten. Somit ist keines der Furocumarine ein Hemmstoff der Topoisomerasen II. Eine eventuelle inhibitorische Potenz auf diese Enzyme in Abhängigkeit der Lichteinwirkung wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht.

3.1.9 Abschließende Diskussion

Die gefundenen Ergebnisse ergeben ein komplexes Bild der Interaktionen der in dieser Arbeit untersuchten Furocumarine in Bezug auf den AhR-Signalweg und das CYP1A1 System. Die wichtigsten Eckpunkte lassen sich zum besseren Überblick wie folgt zusammenfassen:

Angelicin und 8-MOP

- Inhibition der CYP1A-vermittelten EROD-Aktivität in Abhängigkeit vom verwendeten Zellsystem und von den Lichtverhältnissen
- Signifikante mRNA Induktion bei Licht
- Signifikante Erhöhung des CYP1A1 Proteingehaltes unter Lichtausschluss
- Signifikante Induktion der Reportergenaktivität unter Lichtausschluss
- Nur 8-MOP: Hemmung der Topoisomerase I Aktivität unter Lichtausschluss bei einer Konzentration von 100 μM

Isopimpinellin

- Ebenfalls methodisch abhängige Aktivitätshemmung in EROD-Assays
- Keine signifikante mRNA Induktion
- Signifikante Erhöhung des CYP1A1 Proteingehaltes sowohl bei Licht als auch unter Lichtausschluss
- Signifikante Induktion der Reportergenaktivität unter Lichtausschluss

Bergamottin

- Potentester Inhibitor der EROD-Aktivität

- Keine signifikante mRNA Induktion
- Signifikante Erhöhung des CYP1A1 Proteingehaltes unter Lichtausschluss
- Keine Induktion der Reportergenaktivität unabhängig von den Lichtverhältnissen

DHB

- Signifikante Erhöhung des CYP1A1 Proteingehalts unter Lichtausschluss
- Signifikante Induktion der Reportergenaktivität unter Lichtausschluss

Generell sind die Effekte aller Furocumarine stark lichtabhängig. Sie sind alle Inhibitoren der TCDD- induzierten EROD-Aktivität und - bis auf Bergamottin - unter Lichtausschluss gute AhR-Agonisten.

Die ermittelten Daten zur mRNA Expression korrelieren zum Teil nicht mit diesen Ergebnissen. In diesem Zusammenhang muss erwähnt werden, dass alle Analysen mit Zellen erfolgten, die 48 h mit den Substanzen inkubiert wurden. Es ist bekannt, dass eine starke Zeitabhängigkeit der Furocumarin-vermittelten Effekte auf Enzymsysteme besteht. Der Zeitverlauf der Wirkungen von 8-MOP beruht auf den pharmakokinetischen und pharmakodynamischen Eigenschaften, die in mehreren Studien beschrieben werden. 8-MOP wird bei oraler Gabe rasch resorbiert und zeigt einen gesättigten First Pass-Effekt beim Menschen (Brickl et al., 1984; Schmid et al., 1980). Die Plasmakonzentration erreicht ihr Maximum nach 1-2 h abhängig von der Formulierung des 8-MOP und der zeitlich nahen Nahrungsaufnahme. Nach ca. 6 h ist der Plasmagehalt bereits annähernd null, nach 12 h sind 90% der Metabolite des 8-MOP über den Urin ausgeschieden. Allerdings sind die interindividuellen Unterschiede z.B. in der Kinetik sehr hoch. Besondere Relevanz erhalten diese Daten durch die medizinische Anwendung dieses Furocumarins bei der PUVA-Therapie. (Bech-Thomson et al., 1992; deWolff und Thomas, 1986; Schmid et al., 1980; Shepard et al., 2001; Stolk et al., 1985; Sullivan et al., 1986)

Fremdstoff-Furocumarin-Interaktionen sind ebenfalls von dem zeitlichen Verlauf der Applikation der einzelnen Substanzen anhängig (Apseloff et al., 1991; Dresser und Bailey, 2003;

Edwards et al., 1999; Fuhr et al., 2002; Kleiner et al., 2002; Malhotra et al., 2001; Sahi et al., 2002).

Bei *in vivo* Experimenten ist die Art der Furocumarinegabe von entscheidender Bedeutung. Grundsätzlich führt die orale Applikation zu wesentlich stärkeren Wechselwirkungen als z.B. i.v. Verabreichung (Billiard et al., 1995).

In vivo Studien in Sencar Mäusen mit Isopimpinellin und Imperatorin zeigen unterschiedliche Effekte der oral verabreichten Furocumarine auf die EROD- bzw. PROD-Aktivität, je nach dem Zeitrahmen der Messungen (Kleiner et al., 2001). Bergamottin zeigt in Hunden zeit- und applikationsabhängige induktive und inhibitorische Effekte auf verschiedene CYP-Isoenzyme (Sahi et al., 2002). Daher ist anzunehmen, dass unter anderem die nur moderate Erhöhung der CYP1A1 mRNA Expression in im Dunkeln inkubierten Zellen auf die Inkubationsdauer zurückzuführen ist. Die Expressionsbestimmung der mRNA zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Einwirkung von Furocumarinen auf Rattenhepatozyten könnte über den zeitlichen Verlauf der Induktion Aufschluss geben.

Die spezifische Beeinflussung von weiteren CYP-Isoenzymen und Phase II-Enzymen wie Glutathion-S-transferase durch die beschriebenen Furocumarine spielt ebenfalls eine Rolle bei der metabolischen Aktivierung der Substanzen und den hier ermittelten induktiven und inhibitorischen Wirkungen auf das CYP1A1 System (Kleiner et al., 2001; Wen et al., 2002). Dies erklärt auch die teilweise recht großen Schwankungen der Daten etwa bei der Bestimmung der Zytotoxizität.

Die Erkenntnis, dass der Status des CYP1A1 Enzyms stark von den bei den Experimenten vorherrschenden Lichtverhältnissen abhängt, ist neu. Aufgrund der bekannten Photoaktivität und dem daraus resultierenden unterschiedlichen Reaktionspotential der Substanzen überraschen diese Ergebnisse nicht (Caffieri, 2002). Unter Lichtausschluss entsprechen Angelicin, Isopimpinellin und 8-MOP dem Konzept der 'Suizid' Inaktivierung, d.h. sie induzieren ihren eigenen Metabolismus über CYP1A1 und inhibieren nachfolgend dieses Enzym, wahrscheinlich über Bindung an das Apoprotein. Dieser Prozess verläuft über den AhR-Signaltransduktionsweg. Diese „Mechanismus-basierte“ Inhibition tritt nicht bei Lichteinfluss auf, da unter diesen Bedingungen keine agonistisches Potential der Substanzen zur Aktivierung des AhR zu erkennen ist. Die trotz fehlender AhR-Ligandbindung auftretende CYP1A1 Inhibition könnte durch ein erhöhtes Potential der Furocumarine erklärt werden, kovalent an Proteine, DNA etc. zu binden und deren Funktion zu beeinflussen.

Bergamottin ist der potenteste Inhibitor für CYP1A1 in Mikrosomen, es zeigt aber im Gegensatz zu DHB keine Aktivierung des XREs über den AhR. Allerdings ist auch für diese Substanz eine signifikante Steigerung des CYP1A1 Proteingehaltes unter Lichtausschluss zu beobachten. Die CYP1A1 Induktion verläuft somit nicht über eine direkte Aktivierung des AhR. Bergamottin kann die Funktion einer Vielzahl von Proteinen wie CYP-Isoenzymen, Phase II Enzymen, Transportproteinen, etc. beeinträchtigen. Diese Effekte könnten zu einer Akkumulation eines endogenen Agonisten des AhR und damit zu einer CYP1A1 Stabilisierung führen. Des Weiteren könnte die Proteindegradation durch Bindung des Bergamottins an hierfür benötigte Faktoren oder direkte Interaktion mit dem CYP1A1 Enzym gehemmt bzw. blockiert werden.

Furocumarine sind außerdem in der Lage, ROS zu generieren, welche ebenfalls zu einer Induktion des CYP1A1 führen können (Caffieri, 2002; Okamoto et al., 1993). Einen Einfluss von ROS auf die CYP1A1 mRNA Expression insbesondere bei Lichteinwirkung kann daher nicht ausgeschlossen werden.

Die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Ergebnisse zeigen aufgrund des komplexen und lichtabhängigen Wirkungsspektrums der hier untersuchten Furocumarine die Notwendigkeit auf, systemische Effekte durch die Nahrung aufgenommene Furocumarine beim Menschen zu analysieren und deren Folgen für die Gesundheit zu bewerten. So spielt CYP1A1 eine wichtige Rolle bei der metabolischen Aktivierung von Kanzerogenen, was durch die hier untersuchten Furocumarine als Inhibitoren dieses Enzyms vermindert werden könnte (Lee et al., 2002; Kleiner et al., 2002 und 2003). Allerdings sind auch eine Vielzahl von adversen Effekten bekannt (siehe 1.2), was in Bezug auf die tägliche Exposition von Mensch und Tier relevant ist. Die Aufnahme variiert sehr stark abhängig von der Nahrungszusammensetzung. Die durchschnittliche tägliche Aufnahme von Furocumarinen liegt schätzungsweise in einem Bereich von 0,04 bis 1,4 mg pro Person pro Tag. Verzehr von pflanzlichen Lebensmitteln wie Pastinaken führen allerdings zu weit höheren Gehalten, die auch phototoxische Reaktionen auslösen können. (Baumann et al., 1988; COT, 1996; Lombaert et al., 2001; Mongeau et al., 1994; Ostertag et al., 2002; Wagstaff, 1991) Insbesondere in Hinblick auf den Einsatz Furocumarinhaltiger Gemüse und Früchte in Baby- und Kindernahrung sollten weitere Untersuchungen über deren Wirkungen und Metabolismus im Organismus durchgeführt werden (Ostertag et al., 2002). Dies ist auch von Interesse für die mögliche Verwendung dieser Verbindungen als

CYP1A1 Inhibitoren und den Wechselwirkungen mit Xenobiotika, insbesondere pharmakologisch aktiven und prokanzerogenen bzw. kanzerogenen Substanzen.

3.2 AhR-Liganden aus Fermentationen mit Bakterienkulturen aus Rattenfeces

3.2.1 Vorbefunde

Wie Perdew und Babbs bereits 1991 zeigen konnten, sind Bakterienkulturen aus Rattenfeces in der Lage, bei Inkubation mit Tryptophan AhR-Agonisten zu bilden (Perdew und Babbs, 1991). Weitere Untersuchungen bestätigten diese Ergebnisse (Hussong, 1999; Till, 1998). Allerdings konnte bis dato kein Tryptophan-Metabolit mit AhR-aktivierendem Potential isoliert und charakterisiert werden. Dies ist zum einen auf die komplexe Matrix der Reaktionslösung zurückzuführen, zum anderen auf die geringe Ausbeute bei der Fermentation (Baumgart, 2000; Till, 1998). Auf Grundlage dieser Arbeiten wurden weitere Modifikation zur Verbesserung der Methodik durchgeführt.

3.2.2 Grundlegendes Verfahren

Das nachfolgende Schema zeigt den generellen Ablauf des hier angewandten Verfahrens.

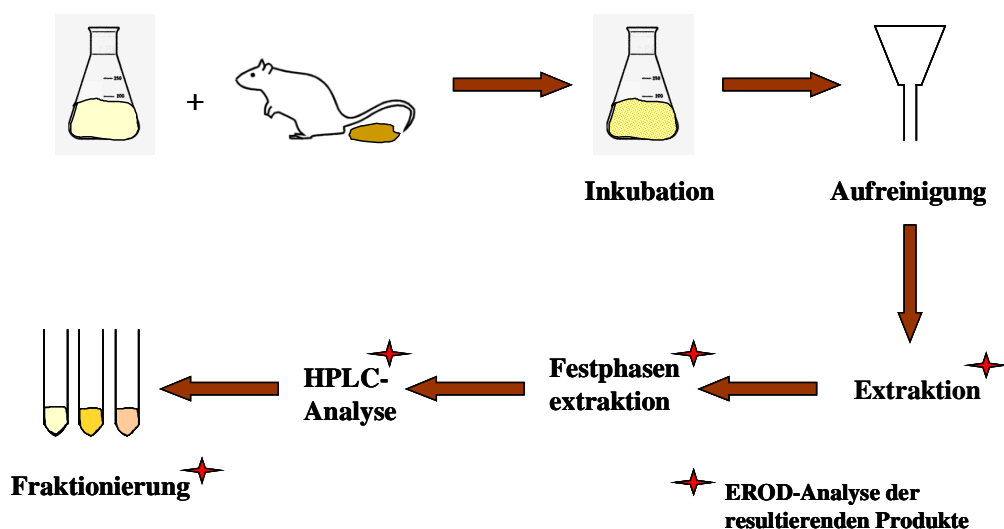


Abbildung 3.25: Verfahrensschema zur Gewinnung von Tryptophan-Metaboliten aus Fermentationen mit Bakterienkulturen aus Rattenfeces

Nach jedem separaten Schritt wurden die erhaltenen Produkte auf ihre EROD-Aktivität hin untersucht und anhand der gewonnenen Daten die zuvor durchgeführten Methoden optimiert. Im Nachfolgenden werden die Ergebnisse für die einzelnen Verfahrensschritte dargestellt und diskutiert. Es ist bekannt, dass Tryptophan auch unter UV-Bestrahlung und durch oxidative Prozesse AhR-Agonisten bildet. So konnte bei Inkubation von Tryptophan ohne Feces eine Steigerung der EROD-Aktivität beobachtet werden, welche allerdings geringer war als bei der Tryptophan-haltigen Fermentation von Bakterienkulturen. (Baumgart, 2000; Till, 1998) Daher wird das gesamte Verfahren soweit wie möglich unter Lichtausschluss durchgeführt, um eventuelle Nebenreaktionen und den Abbau potentieller AhR-Liganden zu vermeiden.

Generell wurden die einzelnen Fermentationsansätze, die zumeist aus mehreren kleinvolumigeren (1 l) Einzelansätzen unter gleichen Bedingungen hergestellt und wegen der geringen Ausbeute an Produkt gepoolt wurden, und deren Extrakte nach jedem Schritt auf ihre EROD-Aktivität hin untersucht. Hierbei konnten teilweise nur Einzelmessungen durchgeführt werden, da die Produktmenge gering war. Die Qualität der gewonnenen Extrakte war sehr unterschiedlich, abhängig unter anderem von der Qualität der Rattenfeces, vom Zeitrahmen der Aufbereitung, von der Lagerung der Ansätze und von der Extraktion.

3.2.3 Aufreinigung

Die Fermentationslösungen wurden nach der Inkubationszeit über verschiedene Verfahren aufgereinigt. Hierbei wurden sowohl Grob- und Fein-Filtrationen am Wasserstrahlvakuum als auch Zentrifugation bei 1000 bis 4000 g für 10 min eingesetzt. Daran anschließend wurde die Lösung über ein festes Mikrofiltersystem (Porendurchmesser 0,45 μM) mit Vorfilter am Ölpumpenvakuum gereinigt. Nach Optimierung dieses Systems in Bezug auf den mechanischen Aufbau und den Pumpendruck, konnte die Inkubationslösung direkt mit reduziertem Zeitaufwand und gleicher resultierender Reinheit nur über dieses System von Schwebstoffen und unerwünschten Partikeln befreit werden. Nachteil dieser Methode ist das relativ große Totvolumen von ca. 2 l. Daher muss bei kleineren Testansätzen auf die anderen zeitintensiveren Verfahren zurückgegriffen werden.

3.2.4 Extraktion

Die Extraktion der aufgereinigten Fermentationslösung erfolgte mit 45% Ethylacetat bezogen auf das Ausgangsvolumen an Inkubationslösung. Untersuchungen haben gezeigt, dass Ethyl-

acetat in Hinblick auf Ausbeute und Handhabbarkeit im Vergleich zu Chloroform und Dichlormethan am geeignetsten ist (Baumgart, 2000).

Weitere Experimente im Rahmen dieser Arbeit mit n-Hexan, Pentan/n-Hexan, Toluol und Diethylether im gleichen Mischungsverhältnis wie bei Ethylacetat führten zu keiner Verbesserung in der Extrakterstellung. Das lag unter anderem an den Lösungsmiteleeigenschaften (z.B. Siedepunkt), was die Trocknung der Extrakte erschwerte, aber auch daran, dass ein Großteil der gewonnenen Extrakte sehr zytotoxisch war und eine Bestimmung der EROD-Aktivität daher unmöglich machte.

Aus 30 l Fermentationsansatz lassen sich etwa 100 mg Rohextrakt gewinnen, wobei nur ein sehr geringer Anteil davon AhR-aktive Substanzen darstellen.

Um die Ausbeute an AhR-Liganden zu verbessern und Verunreinigungen zu vermindern, wurde der Ethylacetatextrakt soweit wie möglich in Methanol gelöst, der Überstand abgetrennt, bei 4000 g für 30 min zentrifugiert und im Vakuum zur Trockne eingeengt. Nachfolgend wurde die EROD-Aktivität des methanolischen Extrakts (MeOH-Extrakt) und des verbleibenden Rückstands (EtAc-Extrakt) in Rattenhepatozyten in Primärkultur bestimmt.

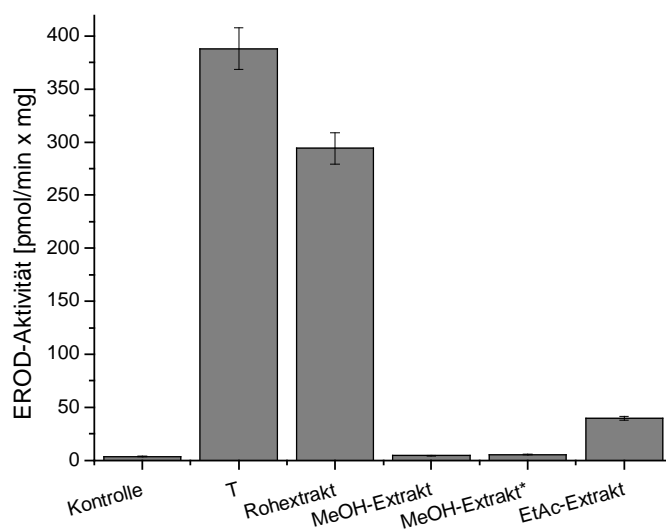


Abbildung 3.26: EROD-Aktivität in primären Rattenhepatozyten nach Inkubation mit Extrakten; Mittelwert \pm Standardabweichung

Um eine Eigenfluoreszenz des MeOH-Extraktes auszuschließen, wurden bei der mit Stern gekennzeichneten Probe des MeOH-Extraktes nicht die Zellen mit dem Extrakt inkubiert, sondern der EROD-Ansatz mit Homogenat aus unbehandelten Zellen. Die Ergebnisse zeigten, dass der Extrakt an sich die Fluoreszenzmessung nicht stört.

Der MeOH-Extrakt zeigte keine Induktion der EROD-Aktivität, während beim EtAc-Extrakt eine schwache Steigerung der EROD-Aktivität zu beobachten war. Allerdings findet man insgesamt eine starke Abnahme an EROD aktiven Substanzen im Vergleich zum Rohextrakt. Dies lässt auf einen Abbau der Verbindungen während des zweiten Extraktionsprozesses schließen. Auch ein Verlust hervorgerufen durch die schlechte Löslichkeit der AhR-Liganden könnte diese Ergebnisse erklären. Insgesamt ist somit eine Extraktion mit Methanol im Anschluss an die Ethylacetatextraktion der Fermentationslösung nicht zur Anreicherung und Aufreinigung von AhR-Agonisten geeignet.

3.2.5 Analyse der aus der Festphasenextraktion gewonnenen Produkte

Das hier verwendete Verfahren der Festphasenextraktion wurde im Rahmen einer Forschungsarbeit etabliert (Pfeffer, 2001). Der Rohextrakt wird über eine C_{18ec}-Festphase aufgereinigt, das Produkt mit Petrolether eluiert und im Vakuum getrocknet. Die Waschfraktion der Säule mit Ethylacetat wird ebenfalls gesammelt und am Rotationsverdampfer getrocknet. Die unterschiedlichen Produkte zeigten im EROD-Assay eine geringe bis mäßige EROD-Induktion, wobei auch in der Waschfraktion AhR-Agonisten nachgewiesen werden konnten.

In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Maurer, Universitätskliniken des Saarlandes, Homburg, wurden diese Fraktionen mittels LC-MS untersucht. Hierbei zeigten sowohl der Rohextrakt als auch die Waschfraktion der C_{18ec}-Festphasensäule im Massenspektrum einen Molekülpeak bei 245,1. Das Produkt der Festphasenextraktion ergab kein verwertbares Spektrum. Aufgrund der teilweise sehr schwachen Signale und der hohen Zahl an Störsubstanzen war eine weitere sinnvolle Analyse aller Fraktionen nicht möglich.

Dieses Festphasenextraktionsverfahren ist somit ungenügend für die Isolierung der gesuchten AhR-Liganden, zeigt aber in bezug auf die Separierung von Begleitstoffen eine Verbesserung im Vergleich zum Rohextrakt. Das Auftreten einer EROD Induktion in mit der Waschfraktion inkubierten Primärhepatozyten spricht für mehrere strukturell unterschiedliche AhR-Liganden in eventuell geringen Mengen, was eine Anreicherung und Aufreinigung noch zusätzlich erschwert.

3.2.6 Zytotoxizität

Ausgehend von mikroskopischen Betrachtungen an Hepatozyten der Ratte in Primärkultur, die für 48 h mit Extrakten behandelt wurden, werden zytotoxische Eigenschaften der Extrakte vermutet. Die Zytotoxizität der Fermentationsextrakte auf diese Zellen wurde über zwei unterschiedliche Verfahren bestimmt, den MTT-Test und den LDH-Assay.

Beim MTT-Assay wird der relative Formazangehalt im Vergleich zur DMSO-Kontrolle (100%) bestimmt. Als Positivkontrolle diente Saponin (S; 1%). Es wurden $n \geq 3$ unabhängige Messreihen durchgeführt.

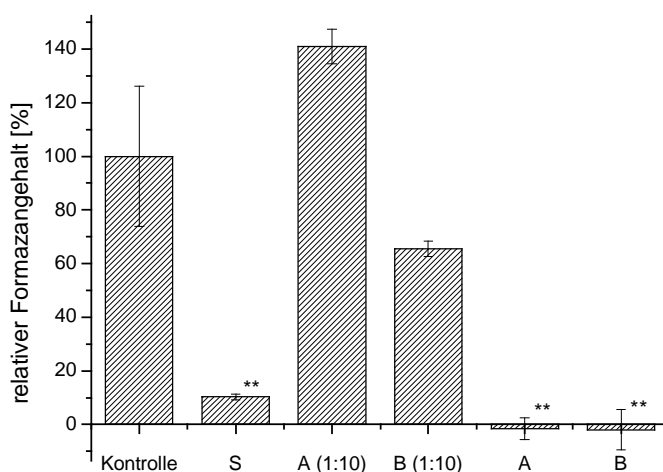


Abbildung 3.27: MTT-Assay von mit Extrakt inkubierten Primärhepatozyten; S: Saponin (1 %); A, B: Rohextrakte, unverdünnt; A, B (1:10): 10fache Verdünnung des Rohextraktes A bzw. B

Die unverdünnten Extrakte A und B zeigten, wie schon unter dem Mikroskop beobachtet, eine signifikante Zytotoxizität, während die 10fache Verdünnung keine signifikante zellschädigende Wirkung aufwies.

Die LDH-Leakage wurde wie in Material und Methoden beschrieben bestimmt. Die Kontrollen waren analog der des MTT-Assays. Bei diesem Experiment wurden vier unterschiedliche Extrakte untersucht, die Extrakte A und B waren Rohextrakte, während C und D über die Festphasenextraktion aufgereinigt waren. Es wurden $n=3$ unabhängige Messreihen durchgeführt.

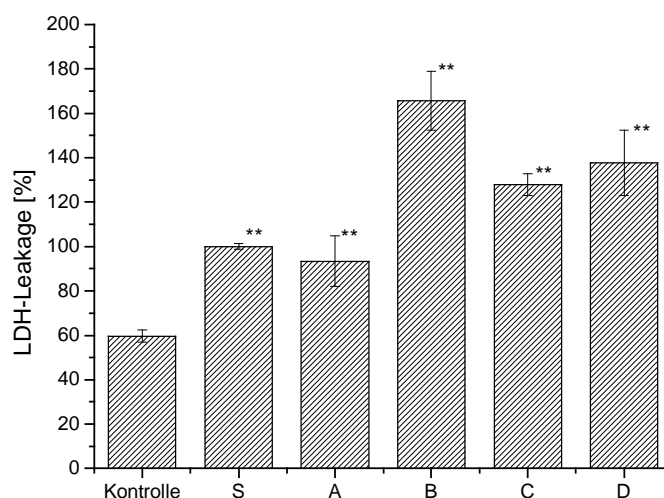


Abbildung 3.28: LDH-Leakage von mit Extrakten inkubierten Primärhepatozyten; S: Saponin (1 %); A, B: Rohextrakte, unverdünnt; C, D: über Festphase aufgereinigte Rohextrakte A, B

Alle untersuchten Extrakte waren deutlich zytotoxisch im Vergleich zur Kontrolle, was die Ergebnisse des MTT-Assays bestätigte. Eine Aufreinigung über die Festphase brachte keine Verbesserung in Bezug auf die Zytotoxizität.

Die für die EROD-Aktivität ermittelten Werte der unterschiedlichen Extrakte in Primärhepatozyten variieren pro Messreihe teilweise stark. Die Schwankungen können auch auf auftretende zytotoxische Effekte zurückgeführt werden. Ob die AhR-Liganden selbst konzentrationsabhängig zytotoxische Eigenschaften aufweisen, konnte nicht geklärt werden. Um zytotoxische Effekt zu vermeiden, wurden daher für die nachfolgenden Experimente weniger konzentrierte Extrakte eingesetzt. Des Weiteren wurden für die EROD-Assays im 48 Well-Format H4IIE-Zellen verwendet, da diese ein stabileres System für die Aktivitätsbestimmung darstellen.

3.2.7 HPLC-Analyse der Extrakte

Der Rohextrakt wurde mit unterschiedlichen HPLC-Programmen bzw. Messverfahren analysiert und die HPLC-Trennung in Hinblick auf eine spätere Fraktionierung der auftretenden Peaks optimiert. Die verwendeten Messprogramme sind in Material und Methoden explizit beschrieben und werden hier nur anhand der dort zugeordneten Programmnummer benannt. Der verwendete Extrakt wurde anfangs je nach Verfahren in einer Konzentration von 0,3

mg/ml in Methanol oder Acetonitril gelöst und nachfolgend abhängig von den gemessenen Spektren verdünnt oder wenn möglich in höherer Konzentration noch einmal analysiert.

Als externe Standards dienten Tryptophan und Indol in einer Konzentration von 1 mM.

Generell war bei der Analyse der Extrakte aus den verschiedenen Fermentationen zu beobachten, dass sich die Spektren teilweise sehr stark unterschieden. Insbesondere war bei den Methoden 1(a) und (b) sowie 3 ein Bereich vorhanden, in dem lediglich ein Buckel ohne separierte Peaks zu detektieren war. Auch HPLC-Programm 5 zeigte im Anfangsbereich keine gute Auftrennung der Peaks.

Die Möglichkeit einer Vorfraktionierung über mehrere Verfahren und deren unterschiedliche Auftrennung zur Bestimmung der EROD-Aktivität der Fraktionsgruppen und damit eventuell einer Konzentrierung auf bestimmte Teilbereiche in der HPLC-Analyse wurde aufgrund der geringen Ausbeute und schlechten Löslichkeit der Produkte verworfen.

Als am besten geeignetes Verfahren für die Untersuchung der Extrakte erwies sich die HPLC-Methode 2 mit einem Methanol-Wasser Gradient von 50% zu 100% Methanol innerhalb von 3 min und einer anschließenden weiteren Elution für 8 min.

3.2.8 Analyse der EROD-Aktivität nach HPLC Fraktionierung

3.2.8.1 Verwendete Extrakte

Die CYP1A-vermittelte EROD-Aktivität wurde für jeden Rohextrakt bzw. dessen aufgereinigte Form bestimmt. H4IIE-Zellen wurden wie in Abschnitt 2 beschrieben kultiviert und für 48 h mit den in DMSO gelösten Extrakten inkubiert. Eine Anzahl von Experimenten mit einzelnen Extrakten ergab, dass eine Konzentration von etwa 4,8 mg Rohextrakt/100 µl DMSO in Hinblick auf Löslichkeit und detektierbare EROD-Aktivität am besten geeignet waren. Allerdings waren hier hohe Qualitätsunterschiede zu beobachten.

Das nachfolgende Diagramm zeigt repräsentativ die EROD-Aktivität eines über Festphasenextraktion aufgereinigten Extrakts. Die Bestimmung erfolgte im Triplikat, dargestellt ist der Mittelwert \pm Standardabweichung.

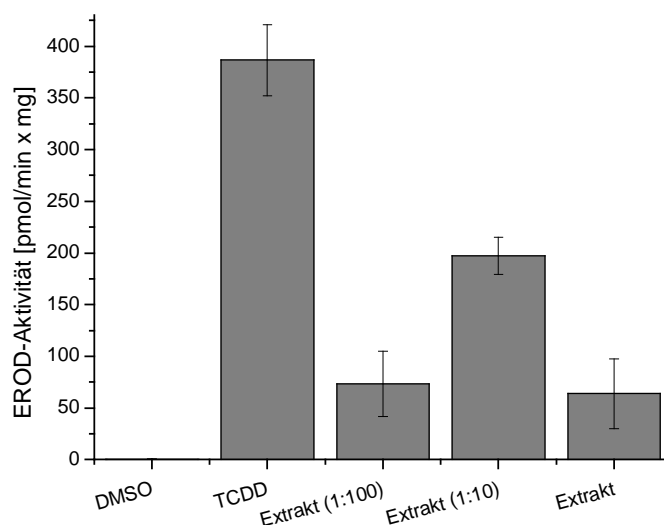


Abbildung 3.29: EROD-Aktivität in H4IIE-Zellen, inkubiert mit Extrakt und Verdünnungen (1:10) und (1:100)

Hier ist deutlich zu erkennen, dass eine 10fache Verdünnung des Extrakts eine wesentlich höhere EROD Induktion zeigt als die Stammlösung, deren Aktivität im Bereich der 1:100 Verdünnung liegt. Mikroskopische Untersuchungen zeigten keine Anzeichen für zytotoxische Effekte. Reporterergenuntersuchungen in Rahmen einer Forschungsarbeit bestätigten diese Ergebnisse (Schädlich, 2002). Ein Zusammenspiel von AhR-Agonisten und –Antagonisten wäre eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung. Ebenso ist eine konzentrationsabhängige Induktion bzw. Inhibition durch einen AhR-Liganden denkbar wie sie z.B. für α -Naphthoflavon nachgewiesen wurde (Merchant et al., 1990 und 1993; Merchant und Safe, 1995; Santostefano et al., 1993). Um diese Problematik zu vermindern, wurde je nach Versuchsbedingungen und Ausbeute die Konzentration der Applikationslösungen angepasst.

3.2.8.2 Fraktionierung

Die Extrakte wurden einer HPLC-Analyse mit Methode 2 unterworfen. Die resultierenden Spektren waren aufgrund der zuvor erläuterten Problematik recht unterschiedlich. Im Nachfolgenden ist das Spektrum des für die Fraktionierung verwendeten Extraktes dargestellt.

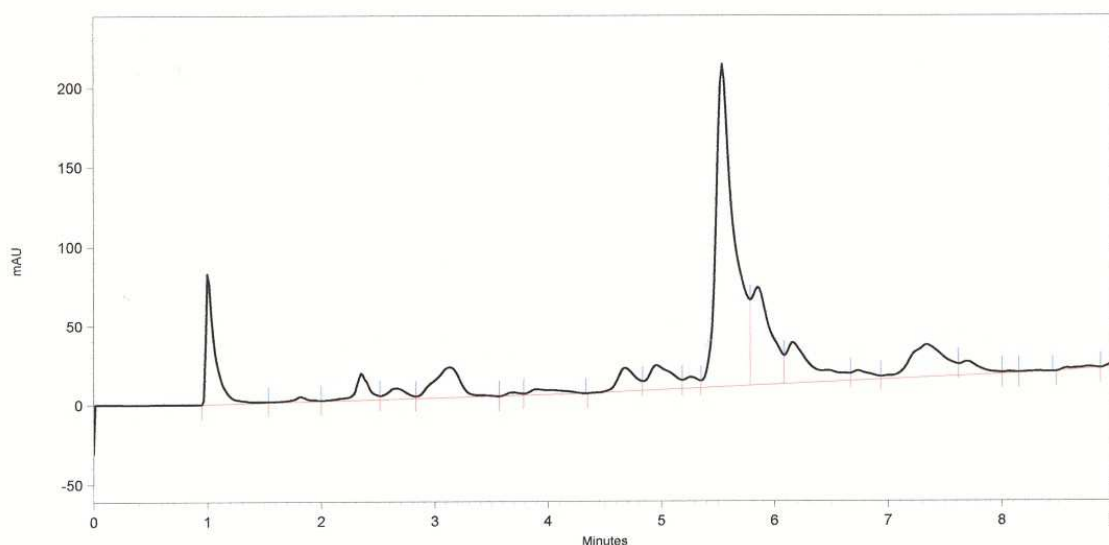


Abbildung 3.30: Repräsentatives HPLC-Chromatogramm eines Extrakts (280 nm); aufgetragen sind Retentionszeit [min] gegen Intensität [mAU]

Es sind 2 deutliche Peaks bei einer Retentionszeit von 1,0 bzw. 5,26 min zu erkennen. Das UV-Spektrum des letztgenannten Peaks zeigt Absorptionsmaxima in Bereich von 250 bis 310 nm, und es konnte keinem verwendeten Standard zugeordnet werden.

Tryptophan konnte anhand der UV-Spektren aufgrund der geringen Intensität der auftretenden Peaks und der überlagernden Matrix nicht identifiziert werden.

Fractionen dieser HPLC Auftrennung aus 6 Läufen über eine Minute und die methanolische Spüllösung wurden gepoolt und nach Aufarbeitung im EROD-Assay untersucht. Dargestellt ist der Mittelwert \pm Standardabweichung aus einer Triplikatbestimmung.

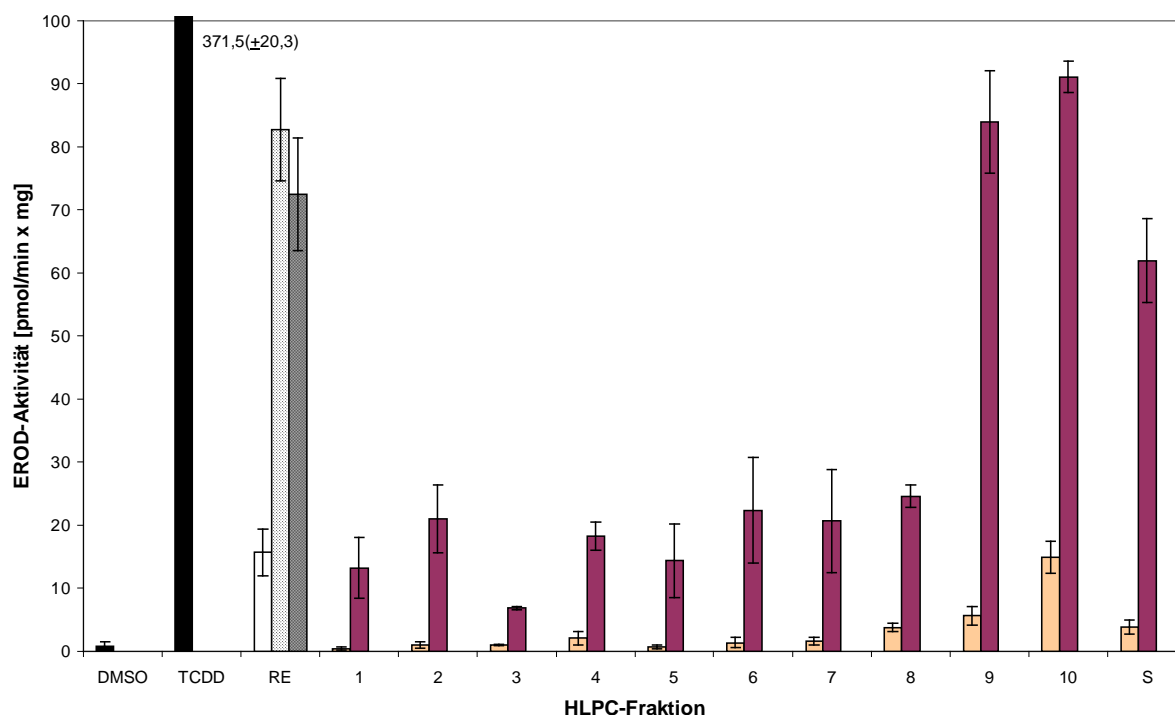


Abbildung 3.31: EROD-Aktivität von H4IIE-Zellen, inkubiert mit Rohextrakt (RE; unverdünn (grau), Verdünnung 1:10 (weiss /gepunktet) und 1:100 (weiss)), den HPLC-Fractionen 1-10 und der Spüllösung (S) (unverdünn (dunkelrot), Verdünnung 1:50 (orange)); TCDD: Positivkontrolle TCDD (1 nM);

Man sieht eine deutliche Induktion der EROD-Aktivität durch den Rohextrakt und seiner 10fachen Verdünnung, sowie durch die Fraktionen 9 und 10. Auch die Spüllösung zeigt eine Steigerung der EROD-Aktivität. Die Größenordnung der Induktion der Fraktionen liegt im selben Rahmen wie die des Rohextraktes. Die Fraktionen 1 bis 8 zeigen eine ungefähr 20fach geringere EROD Induktion als die Positivkontrolle TCDD (1 nM). Die Verdünnungen verursachen nur eine geringe Steigerung der EROD-Aktivität. Vergleichbare Untersuchungen einiger Fraktionen mit Rattenhepatozyten in Primärkultur zeigten qualitativ das gleiche Bild, wobei die Gesamthöhe der EROD Induktion geringer war als bei den hier ermittelten Daten, was zum einen auf die Zytotoxizität der Extrakte und zum anderen auf zellspezifischen Wachstumseigenschaften in 48 Well-Platten zurückzuführen ist (siehe auch Abschnitt 3.2.6).

Die mengenmäßig größten Peaks sind in den Fraktionen 2 und 5 bzw. 6 zu finden. Sie zeigen allerdings keine deutlich erhöhte EROD-Aktivität, was darauf schließen lässt, dass diese Verbindungen keine oder nur schwache AhR-Agonisten sind. Dieses Ergebnis wird durch zuvor durchgeführte Experimente bestätigt (Baumgart, 2000; Till, 1998).

Obwohl in der HPLC-Analyse keine eindeutigen Peaks ab einer Zeit von 8 min erscheinen, ist eine hohe EROD Induktion der Fraktionen aus diesem Bereich festzustellen. Analyse weiterer Extrakte bestätigten diese Ergebnisse, allerdings war die relativ hohe Aktivität der Spüllösung nicht reproduzierbar. Dies könnte daran liegen, dass die unterschiedlichen Matrices der Extrakte zu einer Verschiebung in der Retentionszeit führen und die AhR-Liganden zu früheren Zeiten eluiert werden.

Da die hier gebildeten AhR-Agonisten eine hohe Retentionszeit aufweisen, scheinen sie relativ hydrophil zu sein, was überraschend ist, da die meisten AhR-Liganden lipophile Verbindungen sind.

Aufgrund dieser Daten kann davon ausgegangen werden, dass die AhR-Agonisten sehr potent oder so zahlreich und additiv in ihren Effekten sind, dass sie mittels HPLC-Analyse nicht erfasst werden können. Eine Isolation von einzelnen HPLC-Fractionen führt nicht zu einer Separierung von AhR-Liganden und Verbesserung der EROD Induktion. Sie bietet aber die Möglichkeit der Abtrennung einiger inaktiver und in hoher Konzentration vorkommender Begleitstoffe.

3.2.9 EROD-Aktivität von Fermentationsansätzen mit selektierten Bakterienkulturen

Die Fermentation von Tryptophan mit Bakterienkulturen aus Rattenfeces wurde mit dem Ziel modifiziert, während der Fermentation Bakterien anzureichern, die in der Lage sind, vornehmlich Tryptophan umzusetzen und so eventuell AhR-aktive Metabolite zu generieren. Damit sollte die Ausbeute und das Produktspektrum an AhR-Liganden verbessert werden.

Die Fermentation wurde über 7 Tage wie in Abschnitt 2.2.14.1 unter B)-D) beschrieben durchgeführt. Nachfolgend wurden die Ansätze unter den optimierten Bedingungen aufgereinigt und extrahiert und auf ihre EROD-Aktivität hin untersucht. Die Inkubation mit den Extrakten erfolgte in H4IIE-Zellen über 48 h. Für die Applikationslösungen wurden die Extrakte in einer Konzentration von 4,8 mg/100µl DMSO gelöst. Die EROD-Aktivität einer Triplikatmessung ist nachfolgend dargestellt (Mittelwert \pm Standardabweichung).

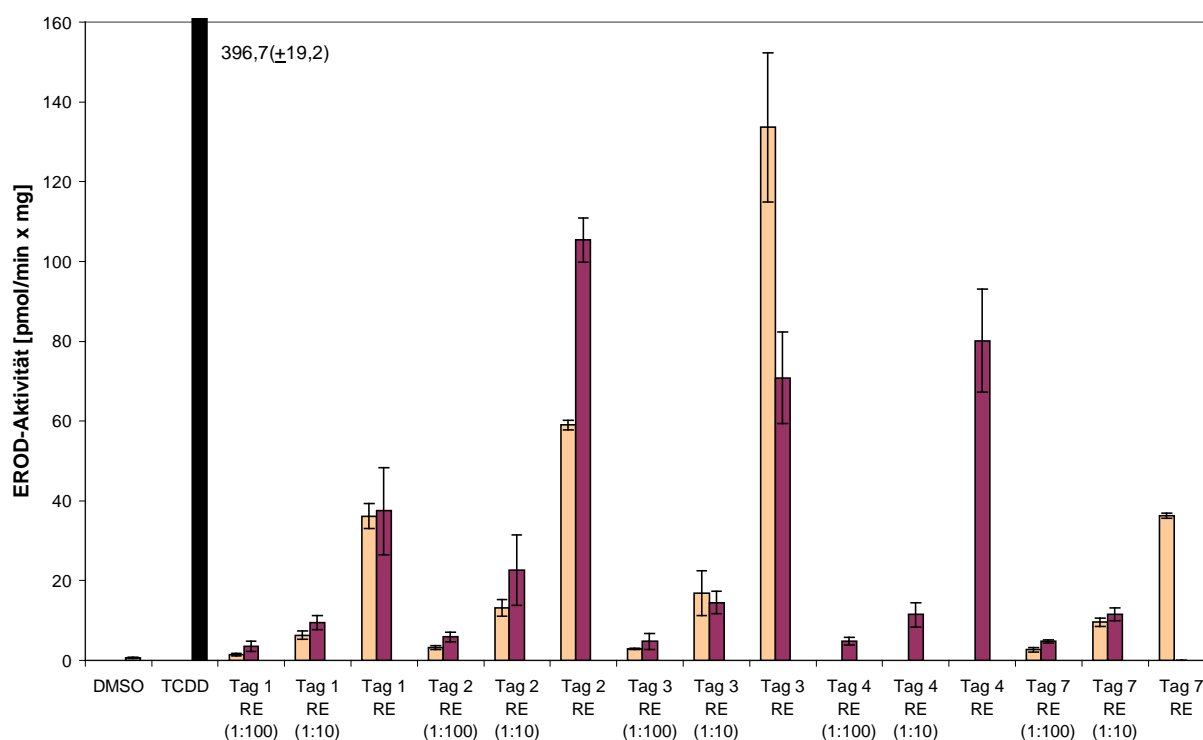


Abbildung 3.32: EROD-Aktivität von H4IIE-Zellen inkubiert mit Extrakten und deren Verdünnungen (1:10 und 1:100) aus unterschiedlichen Fermentationsansätzen in Abhängigkeit von der Zeit; Extrakte aus Fermentationen mit 1 g/l Glucose (orange) und 3 g/l (dunkelrot)

Alle untersuchten Rohextrakte zeigten eine konzentrationsabhängige Induktion der EROD-Aktivität in unterschiedlicher Höhe, abhängig von der Dauer der Fermentation und Zusammensetzung des Ansatzes. Die EROD-Aktivität erreicht ein Maximum bei Extrakten aus den Fermentationen von 2 bis 4 Tagen. Die höchste Induktion, ungefähr ein Drittel im Vergleich zur Positivkontrolle TCDD, ist bei dem Extrakt aus der 3tägigen Inkubation mit niedrigerem Glukose-Gehalt zu finden. Nach 2 Tagen dominiert die Fermentation mit dem höheren Glukose-Anteil von 3 g/l, zeigt aber einen nicht ganz so starken Effekt auf die EROD-Aktivität. Da nach der 4tägigen Fermentation kein verwendbarer Extrakt aus dem Ansatz mit 1 g/l Glukose gewonnen werden konnte, liegt kein Vergleichswert vor.

Diese Daten zeigen, dass der Glukose-Anteil bei der Fermentation einen Einfluss auf die Effektivität hat, mit der AhR-Liganden in Bakterienkultur gebildet werden. Entscheidender jedoch ist die zeitabhängige Zusammensetzung der Bakterienkulturen und deren Fähigkeit, AhR-Liganden zu generieren.

Für den unverdünnten Rohextrakt nach Tag 7 aus dem Fermentationsansatz mit einem Glukose-Gehalt von 3 g/l konnte die EROD-Aktivität nicht bestimmt werden. Die Ursache lag darin, dass die H4IIE-Zellen nach der Inkubation aufgrund der hohen Viskosität und Haftung des Extraktes, der auch nach mehrmaligen Waschversuchen nicht mehr von den Zellen zu spülen war, nicht für die Messung zu verwenden waren.

Eine Extraktisolierung aus den Fermentationen nach Tag 5 war ebenfalls nicht möglich, da die hergestellten Extrakte aufgrund der komplexen Matrix nicht vollständig getrocknet werden konnten und damit für eine Zellinkubation nicht zu Verfügung standen.

Nach Tag 7 ist ein deutlicher Abfall in der EROD induzierenden Potenz der Extrakte zu beobachten. Ein Grund könnte das Absterben der Bakterien oder die Änderung ihrer Zusammensetzung sein, was die Bildung AhR-aktiver Substanzen vermindert oder nach deren Generierung zu einem vermehrten Abbau führt. Auch die Bildung von AhR-Antagonisten kann nicht ausgeschlossen werden.

Die Ausbeute an AhR-Liganden kann somit durch Einsatz von Bakterienkulturen aus überimpften Fermentationsansätzen erhöht werden. Die Bakterienzusammensetzung nach 3 Tagen bei einer Glukosemenge von 1 g/l scheint hierfür am effektivsten. Um nicht für jeden Ansatz eine Wiederholung des Selektionsverfahrens durchführen zu müssen, wurden nach jeder 24 h Inkubation Glyzerinstocks hergestellt und bei -80°C gelagert. Das bietet auch den Vorteil, dass die Fermentationen unabhängig von dem zeitlichen Rahmen der Sammlung von frischer Rattenfeces durchgeführt werden können. Des Weiteren ist der Anteil an unerwünschten Nebenbestandteilen der Fermentationslösungen geringer.

Im Hinblick auf diese Daten ist die Tatsache zu beachten, dass im Gegensatz zur Kurzzeitinkubation bei diesem Verfahren ein Trypton-haltiger Puffer verwendet wurde, um den Bakterien einen idealen Nährboden zu bieten. Dieser erhöht den möglichen verwertbaren Tryptophangehalt der Lösung. Inwieweit dies für die nachfolgenden Experimente und eine mögliche Optimierung der Fermentationsbedingungen eine Rolle spielt, sollte im Rahmen weiterer Untersuchungen geklärt werden.

4 ZUSAMMENFASSUNG

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung von natürlich vorkommenden Substanzen in Bezug auf ihren Einfluss auf die CYP1A-vermittelte EROD-Aktivität und davon abhängig den AhR-Signaltransduktionsweg. Es wurden zwei unterschiedliche Ansätze verfolgt.

Zum einen wurden die natürlich vorkommenden Furocumarine Angelicin, Bergamottin, Isopimpinellin und 8-MOP in Hinblick auf ihre inhibitorischen Eigenschaften auf die CYP1A-vermittelte EROD-Aktivität in verschiedenen Zellmodellen untersucht. Des Weiteren wurde ihre Fähigkeit und die von DHB geprüft, die transkriptionelle Regulation des CYP1A über den AhR zu beeinflussen. Die Lichtabhängigkeit der Effekte dieser Verbindungen wurde aufgrund der bekannten photochemischen Eigenschaften ebenfalls ermittelt. Die wichtigsten Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen:

Alle Furocumarine zeigen eine deutliche Licht-abhängige Inhibition der TCDD-induzierten EROD-Aktivität sowohl in Rattenhepatozyten als auch in Mikrosomen. Die IC_{50} -Werte liegen in einem Bereich von 0,01 bis 15,99 μ M. Die unterschiedliche Potenz der einzelnen Substanzen lässt sich unter anderem auf die strukturellen Unterschiede, die verschiedenen Zellsysteme und die Lichteinwirkung zurückführen.

In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass Angelicin, Isopimpinellin, 8-MOP und DHB bei Lichtausschluss in einer Konzentration von 100 μ M gute AhR-Agonisten sind. Dies konnte in Reportergenexperimenten beobachtet werden. Des Weiteren war eine signifikante konzentrationsabhängige Induktion der CYP1A1 Proteinexpression unter diesen Bedingungen zu erkennen, was die Ergebnisse aus den vorhergehenden Untersuchungen bestätigt. Die teilweise nur schwache *CYP1A1* mRNA Induktion ist vermutlich auf die Zeitabhängigkeit der transkriptionellen Aktivierung in Zusammenhang mit der darauffolgenden Inhibition des CYP1A1 Enzyms zurückzuführen. Experimente mit variierenden Inkubationszeiten könnten weiteren Aufschluss geben über den Zeitverlauf der mRNA Expression der einzelnen Substanzen.

8-MOP hemmt unter Lichtausschluss die Topoisomerase I Aktivität in einer Konzentration von 100 μ M. Eine Hemmung der Topoisomerase II Aktivitäten bei Licht konnte bei keinem Furocumarin beobachtet werden.

Bergamottin ist der potenteste Inhibitor der CYP1A-vermittelten EROD-Aktivität. Es zeigt als einzige Substanz weder bei Licht noch bei Dunkelheit eine Induktion der Luciferase-Aktivität im Reporter-gen und ist somit kein Ligand des AhR. Die Steigerung des CYP1A1 Proteingehalts nach Inkubation unter Lichtausschluss verläuft daher nicht über eine transkriptionelle Aktivierung, sondern über andere Mechanismen (Blockierung der Protein-degradation, etc.)

Alle hier untersuchten Furocumarine mit Ausnahme von Bergamottin entsprechen dem Modell einer Mechanismus-basierten Inhibition des CYP1A1 Enzyms, wenn keine Aktivierung der Substanzen durch Licht erfolgt. Sie fungieren somit als 'Suizid' Inaktivatoren des CYP1A1 über den AhR-Signalweg. Inwieweit andere regulatorische Systeme von den Substanzen beeinflusst werden und welche Effekte dadurch insbesondere in Bezug auf den Fremdstoffmetabolismus hervorgerufen werden, muss in weiteren Studien geklärt werden.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde das Verfahren zur Gewinnung von Tryptophan-Metaboliten aus Bakterienkulturen von Rattenfeces optimiert. Daher wurden unterschiedliche experimentelle Ansätze getestet und die erhaltenen Produkte auf ihre EROD-Aktivität hin überprüft.

Die Tryptophan-abhängige Bildung von AhR-Liganden in Bakterienkulturen aus Rattenfeces konnte in dieser Arbeit bestätigt werden. Aufgrund der geringen Menge an AhR-aktiven Substanzen und einer starken Matrix-bedingten Verunreinigung war eine Charakterisierung einzelner Verbindungen jedoch nicht möglich. Sowohl die Aufreinigung als auch die Extraktion konnte kontinuierlich verbessert werden. Insbesondere in Hinblick auf zytotoxische und eventuell auf die EROD-Aktivität antagonistisch wirkende Begleitstoffe waren die Optimierungen noch nicht ausreichend.

Die HPLC-Analyse über einen Methanol/Wasser-Gradienten bietet die Möglichkeit einer groben Trennung der AhR-Liganden von unerwünschten, in hoher Konzentration auftretenden Begleitstoffen. Die AhR-aktiven Verbindungen waren aufgrund der geringen Konzentration in der HPLC nicht zu detektieren und nur über die gemessene Enzymaktivität zu lokalisieren.

Die Selektion von Bakterienkulturen aus Rattenfeces bei Tryptophaninkubation führte zu einer Erhöhung der EROD-Aktivität des Extraktes nach einer Dauer von 3 Tagen. Die Verwen-

dung dieser Bakterien steigert die Ausbeute an AhR-aktiven Substanzen und ermöglicht damit eine Produktion größerer Mengen, was eine mögliche Isolierung und Charakterisierung der Verbindungen vereinfachen könnte.

5 LITERATUR

Abbott BD, Perdew GH, Birnbaum LS. Ah receptor in embryonic mouse palate and effects of TCDD on receptor expression. *Toxicol Appl Pharmacol.* (1994) **126**(1):16-25.

Abbott BD, Probst MR, Perdew GH, Buckalew AR. AH receptor, ARNT, glucocorticoid receptor, EGF receptor, EGF, TGF alpha, TGF beta 1, TGF beta 2, and TGF beta 3 expression in human embryonic palate, and effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD). *Teratology.* (1998) **58**(2):30-43.

Abel G, Schimmer O. Mutagenicity and toxicity of furocoumarins: comparative investigations in 2 test systems. *Mutat Res.* (1981) **90**(4):451-61.

Abel G, Erdelmeier C, Meier B, Sticher O. Isopimpinellin-a furocoumarin from *Heracleum sphondylium* with chromosome damaging activity. *Planta Med.* (1985) **3**:250-2.

Abel G. Chromosome damage induced in human lymphocytes by 5-methoxypsoralen and 8-methoxypsoralen plus UV-A. *Mutat Res.* (1987) **190**(1):63-8.

Adachi J, Mori Y, Matsui S, Takigami H, Fujino J, Kitagawa H, Miller CA, Kato T, Saeki K, Matsuda T. Indirubin and indigo are potent aryl hydrocarbon receptor ligands present in human urine. *J Biol Chem.* (2001) **276**(34):31475-8.

al-Bayati ZA, Stohs SJ. The possible role of phospholipase A2 in hepatic microsomal lipid peroxidation induced by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in rats. *Arch Environ Contam Toxicol.* (1991) **20**(3):361-5.

Andersson P, McGuire J, Rubio C, Gradin K, Whitelaw ML, Pettersson S, Hanberg A, Poellinger L. A constitutively active dioxin/aryl hydrocarbon receptor induces stomach tumors. *Proc Natl Acad Sci USA.* (2002) **99**(15):9990-5.

Angus WG, Larsen MC, Jefcoate CR. Expression of CYP1A1 and CYP1B1 depends on cell-specific factors in human breast cancer cell lines: role of estrogen receptor status. *Carcinogenesis.* (1999) **20**(6):947-55.

- Antonsson C, Arulampalam V, Whitelaw ML, Pettersson S, Poellinger L. Constitutive function of the basic helix-loop-helix/PAS factor Arnt. Regulation of target promoters via the E box motif. *J Biol Chem.* (1995) **270**(23):13968-72.
- Anttila S, Tuominen P, Hirvonen A, Nurminen M, Karjalainen A, Hankinson O, Elovaara E. CYP1A1 levels in lung tissue of tobacco smokers and polymorphisms of CYP1A1 and aromatic hydrocarbon receptor. *Pharmacogenetics.* (2001) **11**(6):501-9.
- Anzenbacher P, Anzenbacherová E. Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics. *Cell Mol Life Sci.* (2001) **58**(5-6):737-47.
- Apostolou A, Williams RE, Comereski CR. Acute toxicity of micronized 8-methoxypsoralen in rodents. *Drug Chem Toxicol.* (1979) **2**(3):309-13.
- Apseloff G, Hilliard JB, Gerber N, Mays DC. Inhibition and induction of drug metabolism by psoralens: alterations in duration of sleep induced by hexobarbital and in clearance of caffeine and hexobarbital in mice. *Xenobiotica.* (1991) **21**(11):1461-71.
- Armstrong BK, Krickler A. The epidemiology of UV induced skin cancer. *J Photochem Photobiol B.* (2001) **63**(1-3):8-18.
- Artuc M, Stuetgen G, Schalla W, Schaefer H, Gazith J. Reversible binding of 5- and 8-methoxypsoralen to human serum proteins (albumin) and to epidermis in vitro. *Br J Dermatol.* (1979) **101**(6):669-77.
- Ashida H, Shiotani B, Adachi H, Hashimoto T, Kanazawa K, Danno G. Tryptophan pyrolysis products, Trp-P-1 and Trp-P-2 induce apoptosis in primary cultured rat hepatocytes. *Biosci Biotechnol Biochem.* (1998) **62**(11):2283-7.
- Ashida H. Suppressive effects of flavonoids on dioxin toxicity. *Biofactors.* (2000) **12**(1-4):201-6.
- Ashwood-Smith MJ. Frameshift mutations in bacteria produced in the dark by several furocoumarins; absence of activity of 4,5',8-trimethylpsoralen. *Mutat Res.* (1978) **58**(1):23-7.
- Ashwood-Smith MJ, Poulton GA, Barker M, Mildemberger M. 5-Methoxypsoralen, an ingredient in several suntan preparations, has lethal, mutagenic and clastogenic properties. *Nature.* (1980) **285**(5764):407-9.

- Baba T, Mimura J, Gradin K, Kuroiwa A, Watanabe T, Matsuda Y, Inazawa J, Sogawa K, Fujii-Kuriyama Y. Structure and expression of the Ah receptor repressor gene. *J Biol Chem.* (2001) **276**(35):33101-10.
- Babudri N, Pani B, Venturini S, Monti-Bragadin C. Mutagenic activity of four furocoumarins: angelicin, 4,5'-dimethyl-angelicin, psoralen and 8 methyl-psoralen on V79 Chinese hamster cells. *J Environ Pathol Toxicol Oncol.* (1986) **7**(1-2):123-9.
- Backlund M, Johansson I, Mkrtchian S, Ingelman-Sundberg M. Signal transduction-mediated activation of the aryl hydrocarbon receptor in rat hepatoma H4IIE cells. *J Biol Chem.* (1997) **272**(50):31755-63.
- Backlund M, Weidolf L, Ingelman-Sundberg M. Structural and mechanistic aspects of transcriptional induction of cytochrome P450 1A1 by benzimidazole derivatives in rat hepatoma H4IIE cells. *Eur J Biochem.* (1999) **261**(1):66-71.
- Backlund M, Ingelman-Sundberg M. Different structural requirements of the ligand binding domain of the aryl hydrocarbon receptor for high- and low affinity ligand binding and receptor activation. *Mol Pharmacol.* (2004) **65**(2):416-25.
- Bailey DG, Dresser GK, Kreeft JH, Munoz C, Freeman DJ, Bend JR. Grapefruit-felodipine interaction: effect of unprocessed fruit and probable active ingredients. *Clin Pharmacol Ther.* (2000) **68**(5):468-77.
- Bailey DG, Dresser GK, Bend JR. Bergamottin, lime juice, and red wine as inhibitors of cytochrome P450 3A4 activity: comparison with grapefruit juice. *Clin Pharmacol Ther.* (2003) **73**(6):529-37.
- Barthelmes HU, Niederberger E, Roth T, Schulte K, Tang WC, Boege F, Fiebig HH, Eisenbrand G, Marko D. Lycobetaine acts as a selective topoisomerase II beta poison and inhibits the growth of human tumour cells. *Br J Cancer.* (2001) **85**(10):1585-91.
- Bailly C. Topoisomerase I poisons and suppressors as anticancer drugs. *Curr Med Chem.* (2000) **7**(1):39-58.
- Bartsch H, Nair U, Risch A, Rojas M, Wikman H, Alexandrov K. Genetic polymorphism of CYP genes, alone or in combination, as a risk modifier of tobacco-related cancers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* (2000) **9**(1):3-28.

- Bates PJ, Macaulay VM, McLean MJ, Jenkins TC, Reszka AP, Laughton CA, Neidle S. Characteristics of triplex-directed photoadduct formation by psoralen-linked oligodeoxynucleotides. *Nucleic Acids Res.* (1995) **23**(21):4283-9.
- Batt AM, Magdalou J, Vincent-Viry M, Ouzzine M, Fournel-Gigleux S, Galteau MM, Siest G. Drug metabolizing enzymes related to laboratory medicine: cytochromes P-450 and UDP-glucuronosyltransferases. *Clin Chim Acta.* (1994) **226**(2):171-90.
- Baumann U, Dick R, Zimmerli B. Orientierende Untersuchung zum Vorkommen von Furocumarinen in pflanzlichen Lebensmitteln und Kosmetika. *Mitt Gebiete Lebensm Hyg.* (1988) **79**:112-129.
- Baumgart A. Indol-Derivate als Ah(aryl hydrocarbon)-Rezeptor-Liganden. Universität Kaiserslautern, Diplomarbeit. (2000)
- Bech-Thomsen N, Angelo HR, Knudsen EA. The influence of food on 8-methoxypsoralen serum concentration and minimal phototoxic dose. *Br J Dermatol.* (1992) **127**(6):620-4.
- Bech-Thomsen N, Angelo HR, Wulf HC. Skin pigmentation as a predictor of minimal phototoxic dose after oral methoxsalen. *Arch Dermatol.* (1994) **130**(4):464-8.
- Bell DR, Poland A. Binding of aryl hydrocarbon receptor (AhR) to AhR-interacting protein. The role of hsp90. *J Biol Chem.* (2000) **275**(46):36407-14.
- Bendriss EK, Bechtel Y, Bendriss A, Humbert PH, Pintaud G, Magnette J, Agache P, Bechtel PR. Inhibition of caffeine metabolism by 5-methoxypsoralen in patients with psoriasis. *Br J Clin Pharmacol.* (1996) **41**(5):421-4.
- Bergander L, Wahlstrom N, Alsberg T, Bergman J, Rannug A, Rannug U. Characterization of in vitro metabolites of the aryl hydrocarbon receptor ligand 6-formylindolo[3,2-b]carbazole by liquid chromatography-massspectrometry and NMR. *Drug Metab Dispos.* (2003) **31**(2):233-41.
- Bergmeyer HU, Bernt E. Lactate dehydrogenase. In *Methods of Enzymatic Analysis* (ED. Bergmeyer HU). Academic Press, London. (1963):574-579
- Berkley SF, Hightower AW, Beier RC, Fleming DW, Brokopp CD, Ivie GW, Broome CV. Dermatitis in grocery workers associated with high natural concentrations of furanocoumarins in celery. *Ann Intern Med.* (1986) **105**(3):351-5.

Bickers DR, Mukhtar H, Molica SJ Jr, Pathak MA. The effect of psoralens on hepatic and cutaneous drug metabolizing enzymes and cytochrome P-450. *J Invest Dermatol.* (1982) **79**(3):201-5.

Bickers DR, Mukhtar H, Molica SJ Jr, Pathak MA. The effect of psoralens on hepatic and cutaneous drug metabolizing enzymes and cytochrome P-450. *Biochemistry.* (1998) **37**(38):13184-93.

Billard V, Gambus PL, Barr J, Minto CF, Corash L, Tessman JW, Stickney JL, Shafer SL. The pharmacokinetics of 8-methoxypsoralen following i.v. administration in humans. *Br J Clin Pharmacol.* (1995) **40**(4):347-60.

Bjeldanes LF, Kim JY, Grose KR, Bartholomew JC, Bradfield CA. Aromatic hydrocarbon responsiveness-receptor agonists generated from indole-3-carbinol in vitro and in vivo: comparisons with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Proc Natl Acad Sci USA.* (1991) **88**(21):9543-7.

Bock KW. Aryl hydrocarbon or dioxin receptor: biologic and toxic responses. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* (1994) **125**:1-42.

Bonnesen C, Eggleston IM, Hayes JD. Dietary indoles and isothiocyanates that are generated from cruciferous vegetables can both stimulate apoptosis and confer protection against DNA damage in human colon cell lines. *Cancer Res.* (2001) **61**(16):6120-30.

Bordin F, Baccichetti F, Marzano C, Carllassare F, Miolo G, Chilin A, Guiotto A. DNA damage induced by 4,6,8,9-tetramethyl-2H-furo[2,3-h]quinolin-2-one, a new furocoumarin analog: photochemical mechanisms. *Photochem Photobiol.* (2000) **71**(3):254-62.

Boucher PD, Ruch RJ, Hines RN. Specific nuclear protein binding to a negative regulatory element on the human CYP1A1 gene. *J Biol Chem.* (1993) **268**(23):17384-91.

Boucher PD, Piechocki MP, Hines RN. Partial characterization of the human CYP1A1 negatively acting transcription factor and mutational analysis of its cognate DNA recognition sequence. *Mol Cell Biol.* (1995) **15**(9):5144-51.

Bowden JP, Chung KT, Andrews AW. Mutagenic activity of tryptophan metabolites produced by rat intestinal microflora. *J Natl Cancer Inst.* (1976) **57**(4):921-4.

Bradfield CA, Glover E, Poland A. Purification and N-terminal amino acid sequence of the Ah receptor from the C57BL/6J mouse. *Mol Pharmacol.* (1991) **39**(1):13-9.

Bradshaw TD, Trapani V, Vasselin DA, Westwell AD. The aryl hydrocarbon receptor in anti-cancer drug discovery: friend or foe? *Curr Pharm Des.* (2002) **8**(27):2475-90.

Brake PB, Zhang L, Jefcoate CR. Aryl hydrocarbon receptor regulation of cytochrome P4501B1 in rat mammary fibroblasts: evidence for transcriptional repression by glucocorticoids. *Mol Pharmacol.* (1998) **54**(5):825-33.

Brickl R, Schmid J, Koss FW. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of psoralens after oral administration: considerations and conclusions. *Natl Cancer Inst Monogr.* (1984) **66**:63-7.

Burger PM, Simons JW. Mutagenicity and carcinogenicity of 8-MOP/UVA in cell cultures. *Bull Cancer.* (1978) **65**(3):281-2.

Burke MD, Mayer RT. Ethoxyresorufin: direct fluorimetric assay of a microsomal O-dealkylation which is preferentially inducible by 3-methylcholanthrene. *Drug Metab Dispos.* (1974) **2**(6):583-8.

Caffieri S. Reversed-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) determination of lipophilicity of furocoumarins: relationship with DNA interaction. *J Pharm Sci.* (2001) **90**(6):732-9.

Caffieri S. Furocoumarin photolysis: chemical and biological aspects. *Photochem Photobiol Sci.* (2002) **1**(3):149-57.

Cai Y, Bennett D, Nair RV, Ceska O, Ashwood-Smith MJ, DiGiovanni J. Inhibition and inactivation of murine hepatic ethoxy- and pentoxyresorufin O-dealkylase by naturally occurring coumarins. *Chem Res Toxicol.* (1993) **6**:872-9.

Cai Y, Baer-Dubowska W, Ashwood-Smith MJ, Ceska O, Tachibana S, DiGiovanni J. Mechanism-based inactivation of hepatic ethoxyresorufin O-dealkylation activity by naturally occurring coumarins. *Chem Res Toxicol.* (1996) **9**(4):729-36.

Canivenc-Lavier MC, Bentejac M, Miller ML, Leclerc J, Siess MH, Latruffe N, Suschetet M. Differential effects of nonhydroxylated flavonoids as inducers of cytochrome P450 1A and 2B isozymes in rat liver. *Toxicol Appl Pharmacol.* (1996) **136**(2):348-53.

- Cardoso CA, Vilegas W, Barison A, Honda NK. Simultaneous determination of furanocoumarins in infusions and decoctions from "Carapia" (*dorstenia* species) by high-performance liquid chromatography. *J Agric Food Chem.* (2002) **50**(6):1465-9.
- Carver LA, Hogenesch JB, Bradfield CA. Tissue specific expression of the rat Ah-receptor and ARNT mRNAs. *Nucleic Acids Res.* (1994) **22**(15):3038-44.
- Carver LA, Bradfield CA. Ligand-dependent interaction of the aryl hydrocarbon receptor with a novel immunophilin homolog in vivo. *J Biol Chem.* (1997) **272**(17):11452-6.
- Casper RF, Quesne M, Rogers IM, Shirota T, Jolivet A, Milgrom E, Savouret JF. Resveratrol has antagonist activity on the aryl hydrocarbon receptor: implications for prevention of dioxin toxicity. *Mol Pharmacol.* (1999) **56**(4):784-90.
- Cauchi S, Stucker I, Solas C, Laurent-Puig P, Cenee S, Hemon D, Jacquet M, Kremers P, Beaune P, Massaad-Massade L. Polymorphisms of human aryl hydrocarbon receptor (AhR) gene in a French population: relationship with CYP1A1 inducibility and lung cancer. *Carcinogenesis.* (2001) **22**(11):1819-24.
- Chaffin CL, Trewin AL, Hutz RJ. Estrous cycle-dependent changes in the expression of aromatic hydrocarbon receptor (AHR) and AHR-nuclear translocator (ARNT) mRNAs in the rat ovary and liver. *Chem Biol Interact.* (2000) **124**(3):205-16.
- Champoux JJ. Mechanism of catalysis by eukaryotic DNA topoisomerase I. *Adv Pharmacol.* (1994) **29A**:71-82.
- Champoux JJ. DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. *Annu Rev Biochem.* (2001);70:369-413. 5: Cai Y, Baer-Dubowska W, Ashwood-Smith MJ, Ceska O, Tachibana S, DiGiovanni J. Mechanism-based inactivation of hepatic ethoxyresorufin O-dealkylation activity by naturally occurring coumarins. *Chem Res Toxicol.* (1996) **9**(4):729-36.
- Chang CY, Puga A. Constitutive activation of the aromatic hydrocarbon receptor. *Mol Cell Biol.* (1998) **18**(1):525-35.
- Chang YC, Riby J, Chang GH, Peng BC, Firestone G, Bjeldanes LF. Cytostatic and antiestrogenic effects of 2-(indol-3-ylmethyl)-3,3'-diindolylmethane, a major in vivo product of dietary indole-3-carbinol. *Biochem Pharmacol.* (1999) **58**(5):825-34.

Chen YH, Tukey RH. Protein kinase C modulates regulation of the CYP1A1 gene by the aryl hydrocarbon receptor. *J Biol Chem.* (1996) **271**(42):26261-6.

Chen I, McDougal A, Wang F, Safe S. Aryl hydrocarbon receptor-mediated antiestrogenic and antitumorigenic activity of diindolylmethane. *Carcinogenesis.* (1998) **19**(9):1631-9.

Ciolino HP, Daschner PJ, Wang TT, Yeh GC. Effect of curcumin on the aryl hydrocarbon receptor and cytochrome P450 1A1 in MCF-7 human breast carcinoma cells. *Biochem Pharmacol.* (1998) **56**(2):197-206.

Ciolino HP, Daschner PJ, Yeh GC. Dietary flavonols quercetin and kaempferol are ligands of the aryl hydrocarbon receptor that affect CYP1A1 transcription differentially. *Biochem J.* (1999) **340**:715-22.

Ciolino HP, Yeh GC. Inhibition of aryl hydrocarbon-induced cytochrome P-450 1A1 enzyme activity and CYP1A1 expression by resveratrol. *Mol Pharmacol.* (1999) **56**(4):760-7.

Cleaver JE, Killpack S, Gruenert DC. Formation and repair of psoralen-DNA adducts and pyrimidine dimers in human DNA and chromatin. *Environ Health Perspect.* (1985) **62**:127-34.

Conconi MT, Montesi F, Parnigotto PP. Antiproliferative activity and phototoxicity of some methyl derivatives of 5-methoxypsoralen and 5-methoxyangelicin. *Pharmacol Toxicol.* (1998) **82**(4):193-8.

COT, Committee on Toxicity of Chemicals in Food, Consumer products and the Environment. Toxicity, Mutagenicity and Carcinogenicity Report. (1996) <http://www.archive.official-documents.co.uk/dpkument/doh/toxicity/chap-1c.htm>

Crawford RB, Holsapple MP, Kaminski NE. Leukocyte activation induces aryl hydrocarbon receptor up-regulation, DNA binding, and increased Cyp1a1 expression in the absence of exogenous ligand. *Mol Pharmacol.* (1997) **52**(6):921-7.

Crews ST. Control of cell lineage-specific development and transcription by bHLH-PAS proteins. *Genes Dev.* (1998) **12**(5):607-20.

Dall'Acqua F, Terbojevich M, Marciani S, Vedaldi D, Recher M. Investigation of the dark interaction between furocoumarins and DNA. *Chem Biol Interact.* (1978) **21**(1):103-15.

- Dall'Acqua F, Vedaldi D, Bordin F, Rodighiero G. New studies on the interaction between 8-methoxypsoralen and DNA in vitro. *J Invest Dermatol.* (1979) **73**(2):191-7.
- Dalton TP, Puga A, Shertzer HG. Induction of cellular oxidative stress by aryl hydrocarbon receptor activation. *Chem Biol Interact.* (2002) **141**(1-2):77-95.
- Danielson PB. The cytochrome P450 superfamily: biochemistry, evolution and drug metabolism in humans. *Curr Drug Metab.* (2002) **3**(6):561-97.
- de Berker DA, Sakuntabhai A, Diffey BL, Matthews JN, Farr PM. Comparison of psoralen-UVB and psoralen-UVA photochemotherapy in the treatment of psoriasis. *J Am Acad Dermatol.* (1997) **36**(4):577-81.
- de Wolff FA, Thomas TV. Clinical pharmacokinetics of methoxsalen and other psoralens. *Clin Pharmacokinet.* (1986) **11**(1):62-75.
- Delescluse C, Lemaire G, de Sousa G, Rahmani R. Is CYP1A1 induction always related to AHR signaling pathway? *Toxicology.* (2000) **153**(1-3):73-82.
- Denison MS, Fisher JM, Whitlock JP Jr. Inducible, receptor-dependent protein-DNA interactions at a dioxin-responsive transcriptional enhancer. *Proc Natl Acad Sci USA.* (1988) **85**(8):2528-32.
- Denison MS, Heath-Pagliuso S. The Ah receptor: a regulator of the biochemical and toxicological actions of structurally diverse chemicals. *Bull Environ Contam Toxicol.* (1998) **61**(5):557-68.
- Denison MS, Phelan D, Winter GM, Ziccardi MH. Carbaryl, a carbamate insecticide, is a ligand for the hepatic Ah (dioxin)receptor. *Toxicol Appl Pharmacol.* (1998) **152**(2):406-14.
- Denison MS, Pandini A, Nagy SR, Baldwin EP, Bonati L. Ligand binding and activation of the Ah receptor. *Chem Biol Interact.* (2002) **141**(1-2):3-24.
- Denison MS, Nagy SR. Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* (2003) **43**:309-34.
- Dey A, Nebert DW. Markedly increased constitutive CYP1A1 mRNA levels in the fertilized ovum of the mouse. *Biochem Biophys Res Commun.* (1998) **251**(2):657-61.

Diawara MM, Chavez KJ, Hoyer PB, Williams DE, Dorsch J, Kulkosky P, Franklin MR. A novel group of ovarian toxicants: the psoralens. *J Biochem Mol Toxicol.* (1999) **13**(3-4):195-203.

Diawara MM, Williams DE, Oganessian A, Spitsbergen J. Dietary psoralens induce hepatotoxicity in C57 mice. *J Nat Toxins.* (2000) **9**(2):179-95.

Diawara MM, Chavez KJ, Simpleman D, Williams DE, Franklin MR, Hoyer PB. The psoralens adversely affect reproductive function in male wistar rats. *Reprod Toxicol.* (2001) **15**:137-144.

Diawara MM, Kulkosky PJ. Reproductive toxicity of the psoralens. *Pediatr Pathol Mol Med.* (2003) **22**(3):247-58.

Donato MT, Gomez-Lechon MJ, Castell JV. A microassay for measuring cytochrome P450IA1 and P450IIB1 activities in intact human and rat hepatocytes cultured on 96-well plates. *Anal Biochem.* (1993) **213**(1):29-33.

Doyle KM. (editor) Protocols and application guide The source for discovery. Promega Corporation, USA. (1996):240-245

Dragan YP, Schrenk D. Animal studies addressing the carcinogenicity of TCDD(or related compounds) with an emphasis on tumour promotion. *Food Addit Contam.* (2000) **17**(4):289-302.

van Leeuwen FX, Feeley M, Schrenk D, Larsen JC, Farland W, Younes M. Dioxins: WHO's tolerable daily intake (TDI) revisited. *Chemosphere.* (2000) **40**(9-11):1095-101.

Dresser GK, Bailey DG. The effects of fruit juices on drug disposition: a new model for drug interactions. *Eur J Clin Invest.* (2003) **33**(2):10-6.

Dunnick JK, Davis WE Jr, Jorgenson TA, Rosen VJ, McConnell EE. Subchronic toxicity in rats administered oral 8-methoxypsoralen. *Natl Cancer Inst Monogr.* (1984) **66**:91-5.

Edwards DJ, Fitzsimmons ME, Schuetz EG, Yasuda K, Ducharme MP, Warbasse LH, Woster PM, Schuetz JD, Watkins P. 6',7'-Dihydroxybergamottin in grapefruit juice and Seville orange juice: effects on cyclosporine disposition, enterocyte CYP3A4, and P-glycoprotein. *Clin Pharmacol Ther.* (1999) **65**(3):237-44.

- Eisenbrand G, Hippe F, Jakobs S, Muehlbeyer S. Molecular mechanisms of indirubin and its derivatives: novel anticancer molecules with their origin in traditional Chinese phytomedicine. *J Cancer Res Clin Oncol.* (2004) **130**(11):627-35.
- Fitzpatrick TB, Pathak MA. Research and development of oral psoralen and longwave radiation photochemotherapy: 2000 B.C.-1982 A.D. Natl Cancer Inst Monogr. (1984) **66**:3-11.
- Fontaine F, Delescluse C, de Sousa G, Lesca P, Rahmani R. Cytochrome 1A1 induction by primaquine in human hepatocytes and HepG2 cells: absence of binding to the aryl hydrocarbon receptor. *Biochem Pharmacol.* (1999) **57**(3):255-62.
- Fort P, Marty L, Piechaczyk M, el Sabrouty S, Dani C, Jeanteur P, Blanchard JM. Various rat adult tissues express only one major mRNA species from the glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase multigenic family. *Nucleic Acids Res.* (1985) **13**(5):1431-42.
- Fouin-Fortunet H, Tinel M, Descatoire V, Letteron P, Larrey D, Geneve J, Pessayre D. Inactivation of cytochrome P-450 by the drug methoxsalen. *J Pharmacol Exp Ther.* (1986) **236**(1):237-47.
- Freeman BC, Felts SJ, Toft DO, Yamamoto KR. The p23 molecular chaperones act at a late step in intracellular receptor action to differentially affect ligand efficacies. *Genes Dev.* (2000) **14**(4):422-34.
- Frentz G, Olsen JH. Malignant tumours and psoriasis: a follow-up study. *Br J Dermatol.* (1999) **140**(2):237-42.
- Freshney RI. Culture of animal cells: A manual for basic technique. Wiley-Liss, New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Signapore. (1994)
- Fuhr U, Muller-Peltzer H, Kern R, Lopez-Rojas P, Junemann M, Harder S, Staib AH. Effects of grapefruit juice and smoking on verapamil concentrations in steady state. *Eur J Clin Pharmacol.* (2002) **58**(1):45-53.
- Garbe C. The sun and malignant melanoma. *Hautarzt.* (1992) **43**(5):251-7.
- Gasparro FP, Liao B, Foley PJ, Wang XM, McNiff JM. Psoralen photochemotherapy, clinical efficacy, and photomutagenicity: the role of molecular epidemiology in minimizing risks. *Environ Mol Mutagen.* (1998) **31**(2):105-12.

- Gielen JE, Goujon FM, Nebert DW. Genetic regulation of aryl hydrocarbon hydroxylase induction. II. Simple Mendelian expression in mouse tissues in vivo. *J Biol Chem.* (1972) **247**(4):1125-37.
- Gillner M, Bergman J, Cambillau C, Alexandersson M, Fernstrom B, Gustafsson JA. Interactions of indolo[3,2-b]carbazoles and related polycyclic aromatic hydrocarbons with specific binding sites for 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p dioxin in rat liver. *Mol Pharmacol.* (1993) **44**(2):336-45.
- Goerz G, Merk H, Bolsen K, Tsambaos D, Berger H. Influence of chronic UV-light exposure on hepatic and cutaneous monooxygenases. *Experientia.* (1983) **39**(4):385-6.
- Goerz G, Barnstorf W, Winnekendonk G, Bolsen K, Fritsch C, Kalka K, Tsambaos D. Influence of UVA and UVB irradiation on hepatic and cutaneous P450 isoenzymes. *Arch Dermatol Res.* (1996) **289**(1):46-51.
- Gonzalez FJ, Kimura S. Study of P450 function using gene knockout and transgenic mice. *Arch Biochem Biophys.* (2003) **409**(1):153-8.
- Gradelet S, Astorg P, Pineau T, Canivenc MC, Siess MH, Leclerc J, Lesca P. Ah receptor-dependent CYP1A induction by two carotenoids, canthaxanthin and beta-apo-8'-carotenal, with no affinity for the TCDD binding site. *Biochem Pharmacol.* (1997) **54**(2):307-15.
- Greenblatt DJ, von Moltke LL, Harmatz JS, Chen G, Weemhoff JL, Jen C, Kelley CJ, LeDuc BW, Zinny MA. Time course of recovery of cytochrome p450 3A function after single doses of grapefruit juice. *Clin Pharmacol Ther.* (2003) **74**(2):121-9.
- Gruenert DC, Ashwood-Smith M, Mitchell RH, Cleaver JE. Induction of DNA-DNA cross-link formation in human cells by various psoralen derivatives. *Cancer Res.* (1985) **45**:5394-8.
- Guengerich PF, Martin MV, McCormick WA, Nguyen LP, Glover E, Bradfield CA. Aryl hydrocarbon receptor response to indigoids in vitro and in vivo. *Arch Biochem Biophys.* (2004) **423**(2):309-16.
- Guo LQ, Taniguchi M, Xiao YQ, Baba K, Ohta T, Yamazoe Y. Inhibitory effect of natural furanocoumarins on human microsomal cytochrome P450 3A activity. *Jpn J Pharmacol.* (2000) **82**(2):122-9.

Guo LQ, Taniguchi M, Chen QY, Baba K, Yamazoe Y. Inhibitory potential of herbal medicines on human cytochrome P450-mediated oxidation: properties of umbelliferous or citrus crude drugs and their relative prescriptions. *Jpn J Pharmacol.* (2001) **85**(4):399-408.

Guo LQ, Yamazoe Y. Inhibition of cytochrome P450 by furanocoumarins in grapefruit juice and herbal medicines. *Acta Pharmacol Sin.* (2004) **25**(2):129-36.

Gwang JH. Induction of rat hepatic cytochrome P4501A and P4502B by the methoxsalen. *Cancer Lett.* (1996) **109**(1-2):115-20.

Hahn ME. The aryl hydrocarbon receptor: a comparative perspective. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol.* (1998) **121**(1-3):23-53.

Hahn ME. Aryl hydrocarbon receptors: diversity and evolution. *Chem Biol Interact.* (2002) **141**(1-2):131-60.

Hankinson O. Dominant and recessive aryl hydrocarbon hydroxylase-deficient mutants of mouse hepatoma line, Hepa-1, and assignment of recessive mutants to three complementation groups. *Somatic Cell Genet.* (1983) **9**(4):497-514.

Hankinson O, Andersen RD, Birren BW, Sander F, Negishi M, Nebert DW. Mutations affecting the regulation of transcription of the cytochrome P1 450 gene in the mouse Hepa-1 cell line. *J Biol Chem.* (1985) **260**(3):1790-5.

Hankinson O. The aryl hydrocarbon receptor complex. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* (1995) **35**:307-40.

Harper PA, Wong JY, Lam MS, Okey AB. Polymorphisms in the human AH receptor. *Chem Biol Interact.* (2002) **141**(1-2):161-87.

Hayashi S, Watanabe J, Nakachi K, Eguchi H, Gotoh O, Kawajiri K. Interindividual difference in expression of human Ah receptor and related P450 genes. *Carcinogenesis.* (1994) **15**(5):801-6.

He K, Iyer KR, Hayes RN, Sinz MW, Woolf TF, Hollenberg PF. Inactivation of cytochrome P450 3A4 by bergamottin, a component of grapefruit juice. *Chem Res Toxicol.* (1998) **11**(4):252-9.

- Heath-Pagliuso S, Rogers WJ, Tullis K, Seidel SD, Ceniñ PH, Brouwer A, Denison MS. Activation of the Ah receptor by tryptophan and tryptophan metabolites. *Biochemistry*. (1998) **37**(33):11508-15.
- Heid SE, Pollenz RS, Swanson HI. Role of heat shock protein 90 dissociation in mediating agonist-induced activation of the aryl hydrocarbon receptor. *Mol Pharmacol*. (2000) **57**(1):82-92.
- Henderson GL, Harkey MR, Gershwin ME, Hackman RM, Stern JS, Stresser DM. Effects of ginseng components on c-DNA-expressed cytochrome P450 enzyme catalytic activity. *Life Sci*. (1999) **65**(15):209-14.
- Henry EC, Kende AS, Rucci G, Totleben MJ, Willey JJ, Dertinger SD, Pollenz RS, Jones JP, Gasiewicz TA. Flavone antagonists bind competitively with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) to the aryl hydrocarbon receptor but inhibit nuclear uptake and transformation. *Mol Pharmacol*. (1999) **55**(4):716-25.
- Herold H, Berbey B, Angignard D, Le Duc R. Toxicological study of the compound 5-methoxypsoralen (5-MOP). In *Psoralens in Cosmetics and Dermatology* (ED. Cahn J, Forlot P, Grupper C, Maybeck A, Urbach F). Pergamon Press, New York. (1981):303-309.
- Hines RN, Mathis JM, Jacob CS. Identification of multiple regulatory elements on the human cytochrome P450IA1 gene. *Carcinogenesis*. (1988) **9**(9):1599-605.
- Ho PC, Saville DJ, Coville PF, Wanwimolruk S. Content of CYP3A4 inhibitors, naringin, naringenin and bergapten in grapefruit and grapefruit juice products. *Pharm Acta Helv*. (2000) **74**(4):379-85.
- Ho PC, Saville DJ, Wanwimolruk S. Inhibition of human CYP3A4 activity by grapefruit flavonoids, furanocoumarins and related compounds. *J Pharm Sci*. (2001) **4**(3):217-27.
- Hodek P, Trefil P, Stiborova M. Flavonoids-potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450. *Chem Biol Interact*. (2002) **139**(1):1-21.
- Hoessel R, Leclerc S, Endicott JA, Nobel ME, Lawrie A, Tunnah P, Leost M, Damiens E, Marie D, Marko D, Niederberger E, Tang W, Eisenbrand G, Meijer L. Indirubin, the active constituent of a Chinese antileukaemia medicine, inhibits cyclin-dependent kinases. *Nat Cell Biol*. (1999) **1**(1):60-7.

- Huff J, Lucier G, Tritscher A. Carcinogenicity of TCDD: experimental, mechanistic, and epidemiologic evidence. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* (1994) **34**:343-72.
- Hukkanen J, Lassila A, Paivarinta K, Valanne S, Sarpo S, Hakkola J, Pelkonen O, Raunio H. Induction and regulation of xenobiotic-metabolizing cytochrome P450s in the human A549 lung adenocarcinoma cell line. *Am J Respir Cell Mol Biol.* (2000) **22**(3):360-6.
- Hung CF, Holzmacher R, Connolly E, Berenbaum MR, Schuler MA. Conserved promotor elements in the *CYP6B* gene family suggest common ancestry for cytochrome P450 monooxygenases mediating furanocoumarin detoxification. *Proc Natl Acad Sci USA.* (1996) **93**: 12200-5
- Hussong R. Charakterisierung von Agonisten des Dioxinrezeptors aus dem Tryptophanmetabolismus der intestinalen Mikroflora. Universität Kaiserslautern, Diplomarbeit. (1999)
- Inouye K, Mae T, Kondo S, Ohkawa H. Inhibitory effects of vitamin A and vitamin K on rat cytochrome P4501A1-dependent monooxygenase activity. *Biochem Biophys Res Commun.* (1999) **262**(2):565-9.
- Isaacs ST, Wieseahn G, Hallick LM. In vitro characterization of the reaction of four psoralen derivatives with DNA. *Natl Cancer Inst Monogr.* (1984) **66**:21-30.
- Ivie GW, Macgregor JT, Hammock BD. Mutagenicity of psoralen epoxides. *Mutat Res.* (1980) **79**(1):73-7.
- Jakovljevic V, Raskovic A, Popovic M, Sabo J, Bursac M. The effect methoxsalene on hypnotic and subhypnotic doses of pentobarbital. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet.* (2002) **27**(3):149-51.
- Jaspersen-Schib R, Theus L, Guirguis-Oeschger M, Gossweiler B, Meier-Abt PJ. Wichtige Pflanzenvergiftungen in der Schweiz 1966-1994. *Schweiz Med Wochenschr.* (1996) **126**:1085-98.
- Jellinck PH, Forkert PG, Riddick DS, Okey AB, Michnovicz JJ, Bradlow HL. Ah receptor binding properties of indole carbinols and induction of hepatic estradiol hydroxylation. *Biochem Pharmacol.* (1993) **45**(5):1129-36.

- Jeong HG, Yun CH, Jeon YJ, Lee SS, Yang KH. Suppression of cytochrome P450 (Cyp1a-1) induction in mouse hepatoma Hepa-1C1C7 cells by methoxsalen. *Biochem Biophys Res Commun.* (1995) **208**(3):1124-30.
- Jeuken A, Keser BJ, Khan E, Brouwer A, Koeman J, Denison MS. Activation of the Ah receptor by extracts of dietary herbal supplements, vegetables, and fruits. *J Agric Food Chem.* (2003) **51**(18):5478-87.
- Joshi PC, Pathak MA. Production of singlet oxygen and superoxide radicals by psoralens and their biological significance. *Biochem Biophys Res Commun.* (1983) **112**(2):638-46.
- Kapitulnik J, Gonzalez FJ. Marked endogenous activation of the CYP1A1 and CYP1A2 genes in the congenitally jaundiced Gunn rat. *Mol Pharmacol.* (1993) **43**(5):722-5.
- Karchner SI, Franks DG, Powell WH, Hahn ME. Regulatory interactions among three members of the vertebrate aryl hydrocarbon receptor family: AHR repressor, AHR1, and AHR2. *J Biol Chem.* (2002) **277**(9):6949-59.
- Kazlauskas A, Poellinger L, Pongratz I. Evidence that the co-chaperone p23 regulates ligand responsiveness of the dioxin (Aryl hydrocarbon) receptor. *J Biol Chem.* (1999) **274**(19):13519-24.
- Kennedy SW, Jones SP. Simultaneous measurement of cytochrome P4501A catalytic activity and total protein concentration with a fluorescence plate reader. *Anal Biochem.* (1994) **222**(1):217-23.
- Kennedy SW, Jones SP, Bastien LJ. Efficient analysis of cytochrome P4501A catalytic activity, porphyrins, and total proteins in chicken embryo hepatocyte cultures with a fluorescence plate reader. *Anal Biochem.* (1995) **226**(2):362-70.
- Kharasch ED, Hankins DC, Taraday JK. Single-dose methoxsalen effects on human cytochrome P-450 2A6 activity. *Drug Metab Dispos.* (2000) **28**(1):28-33.
- Kimura S, Smith HH, Hankinson O, Nebert DW. Analysis of two benzo[a]pyrene-resistant mutants of the mouse hepatoma Hepa-1 P(1)450 gene via cDNA expression in yeast. *EMBO J.* (1987) **6**(7):1929-33.
- Kittler L. The molecular mechanism of the photochemical reaction of furocoumarins with nucleic acids. *Z Gesamte Inn Med.* (1976) **31**(22):920-3.

Kleiner HE, Vulimiri SV, Miller L, Johnson WH Jr, Whitman CP, DiGiovanni J. Oral administration of naturally occurring coumarins leads to altered phase I and II enzyme activities and reduced DNA adduct formation by polycyclic aromatic hydrocarbons in various tissues of SENCAR mice. *Carcinogenesis*. (2001) **22**(1):73-82.

Kleiner HE, Vulimiri SV, Reed MJ, Uberecken A, DiGiovanni J. Role of cytochrome P450 1a1 and 1b1 in the metabolic activation of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene and the effects of naturally occurring furanocoumarins on skin tumor initiation. *Chem Res Toxicol*. (2002) **15**(2):226-35.

Kleiner HE, Vulimiri SV, Starost MF, Reed MJ, DiGiovanni J. Oral administration of the citrus coumarin, isopimpinellin, blocks DNA adduct formation and skin tumor initiation by 7,12-dimethylbenz[a]anthracene in SENCAR mice. *Carcinogenesis*. (2002) **23**(10):1667-75.

Kleiner HE, Reed MJ, DiGiovanni J. Naturally occurring coumarins inhibit human cytochromes P450 and block benzo[a]pyrene and 7,12 dimethylbenz[a]anthracene DNA adduct formation in MCF-7 cells. *Chem Res Toxicol*. (2003) **16**(3):415-22.

Kleman MI, Poellinger L, Gustafsson JA. Regulation of human dioxin receptor function by indolocarbazoles, receptor ligands of dietary origin. *J Biol Chem*. (1994) **269**(7):5137-44.

Koenigs LL, Trager WF. Mechanism-based inactivation of cytochrome P450 2B1 by 8-methoxypsoralen and several other furanocoumarins. *J Invest Dermatol*. (1982) **79**(3):201-5.

Koenigs LL, Peter RM, Thompson SJ, Rettie AE, Trager WF. Mechanism-based inactivation of human liver cytochrome P450 2A6 by 8-methoxypsoralen. *Drug Metab Dispos*. (1997) **25**(12):1407-15.

Koenigs LL, Trager WF. Mechanism-based inactivation of P450 2A6 by furanocoumarins. *Biochemistry*. (1998) **37**(28):10047-61.

Kolluri SK, Weiss C, Koff A, Gottlicher M. p27(Kip1) induction and inhibition of proliferation by the intracellular Ah receptor in developing thymus and hepatoma cells. *Genes Dev*. (1999) **13**(13):1742-53.

Kostrubsky VE, Ramachandran V, Venkataramanan R, Dorko K, Esplen JE, Zhang S, Sinclair JF, Wrighton SA, Strom SC. The use of human hepatocyte cultures to study the induction of cytochrome P-450. *Drug Metab Dispos*. (1999) **27**(8):887-94.

- Kravchenko LV, Avren'eva LI, Guseva GV, Posdnyakov AL, Tutel'yan VA. Effect of nutritional indoles on activity of xenobiotic metabolism enzymes and T-2 toxicity in rats. *Bull Exp Biol Med.* (2001) **131**(6):544-7.
- Kühnau J. The flavonoids. A class of semi-essential food components: Their role in human nutrition. *Wid Rev Nutr Diet.* (1976) **24**:117-191.
- Labbe G, Descatoire V, Beaune P, Letteron P, Larrey D, Pessayre D. Suicide inactivation of cytochrome P-450 by methoxsalen. Evidence for the covalent binding of a reactive intermediate to the protein moiety. *J Pharmacol Exp Ther.* (1989) **250**(3):1034-42.
- LaPres JJ, Glover E, Dunham EE, Bunger MK, Bradfield CA. ARA9 modifies agonist signaling through an increase in cytosolic aryl hydrocarbon receptor. *J Biol Chem.* (2000) **275**(9):6153-9.
- Laskin JD. Mechanisms of psoralen action in the skin. *J Am Coll Toxicol.* (1989) **8**(5):797-800.
- Lautraite S, Musonda AC, Doehmer J, Edwards GO, Chipman JK. Flavonoids inhibit genetic toxicity produced by carcinogens in cells expressing CYP1A2 and CYP1A1. *Mutagenesis.* (2002) **17**(1):45-53.
- Ledirac N, Delescluse C, de Sousa G, Pralavorio M, Lesca P, Amichot M, Berge JB, Rahmani R. Carbaryl induces CYP1A1 gene expression in HepG2 and HaCaT cells but is not a ligand of the human hepatic Ah receptor. *Toxicol Appl Pharmacol.* (1997) **144**(1):177-82.
- Ledirac N, Delescluse C, Lesca P, Piechocki MP, Hines RN, de Sousa G, Pralavorio M, Rahmani R. Diflubenzuron, a benzoyl-urea insecticide, is a potent inhibitor of TCDD-induced CYP1A1 expression in HepG2 cells. *Toxicol Appl Pharmacol.* (2000) **164**(3):273-9.
- Lee IJ, Jeong KS, Roberts BJ, Kallarakal AT, Fernandez-Salguero P, Gonzalez FJ, Song BJ. Transcriptional induction of the cytochrome P4501A1 gene by a thiazolium compound, YH439. *Mol Pharmacol.* (1996) **49**(6):980-8.
- Lee YM, Chen SF, Li YC, Lin SS, Chung JG. Oral administration of 5-methoxypsoralen affects the distribution and metabolism of 2-aminofluorene in Sprague-Dawley rats. *In Vivo.* (2002) **16**(3):201-13.

- Lees MJ, Whitelaw ML. Multiple roles of ligand in transforming the dioxin receptor to an active basic helix-loop-helix/PAS transcription factor complex with the nuclear protein Arnt. *Mol Cell Biol.* (1999) **19**(8):5811-22.
- Lees MJ, Peet DJ, Whitelaw ML. Defining the role for XAP2 in stabilization of the dioxin receptor. *J Biol Chem.* (2003) **278**(38):35878-88.
- Li X, Schuler MA, Berenbaum MR. Jasmonate and salicylate induce expression of herbivore cytochrome P450 genes. *Nature.* (2002) **419**(6908):712-5.
- Lin TM, Ko K, Moore RW, Buchanan DL, Cooke PS, Peterson RE. Role of the aryl hydrocarbon receptor in the development of control and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-exposed male mice. *J Toxicol Environ Health A.* (2001) **64**(4):327-42.
- Lindebro MC, Poellinger L, Whitelaw ML. Protein-protein interaction via PAS domains: role of the PAS domain in positive and negative regulation of the bHLH/PAS dioxin receptor-Arnt transcription factor complex. *EMBO J.* (1995) **14**(14):3528-39.
- Lindelöf B. Risk of melanoma with psoralen/ultraviolet A therapy for psoriasis. *Drug Safety.* (1999) **20**(4):289-297.
- Lindl T, Bauer J. Zell- und Gewebekultur. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Jena, New York. (1994)
- Liu H, Wormke M, Safe SH, Bjeldanes LF. Indolo[3,2-b]carbazole: a dietary-derived factor that exhibits both antiestrogenic and estrogenic activity. *J Natl Cancer Inst.* (1994) **86**(23):1758-65.
- Liu Y, Peterson DA, Kimura H, Schubert D. Mechanism of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. *J Neurochem.* (1997) **69**(2):581-93.
- Ljunggren B. Severe phototoxic burn following celery ingestion. *Arch Dermatol.* (1990) **126**(10):1334-6.
- Löber G, Kittler L, Beensen V, Schaarschmidt H, Knopf B. Differential effects of treatment with UV-light (365 nm) and 8-methoxypsoralen on chromosomes of healthy persons and psoriatic patients. *Biomed Biochim Acta.* (1986) **45**(3):343-51.

- Lombaert GA, Siemens KH, Pellaers P, Mankotia M, Ng W. Furanocoumarins in celery and parsnips: method and multiyear Canadian survey. *J AOAC Int.* (2001) **84**(4):1135-43.
- Long WP, Perdew GH. Lack of an absolute requirement for the native aryl hydrocarbon receptor (AhR) and AhR nuclear translocator transactivation domains in protein kinase C-mediated modulation of the AhR pathway. *Arch Biochem Biophys.* (1999) **371**(2):246-59.
- Lopez-Lazaro M, Martin-Cordero C, Toro MV, Ayuso MJ. Flavonoids as DNA topoisomerase I poisons. *J Enzyme Inhib Med Chem.* (2002) **17**(1):25-9.
- Loveday KS, Donahue BA. Induction of sister chromatid exchanges and gene mutations in Chinese hamster ovary cells by psoralens. *Natl Cancer Inst Monogr.* (1984) **66**:149-55.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* (1951) **193**(1):265-75.
- Lusska A, Wu L, Whitlock JP Jr. Superinduction of CYP1A1 transcription by cycloheximide. Role of the DNA binding site for the liganded Ah receptor. *J Biol Chem.* (1992) **267**(21):15146-51.
- Ma Q, Whitlock JP Jr. The aromatic hydrocarbon receptor modulates the Hepa 1c1c7 cell cycle and differentiated state independently of dioxin. *Mol Cell Biol.* (1996) **16**(5):2144-50.
- Ma Q, Baldwin KT. 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced degradation of aryl hydrocarbon receptor (AhR) by the ubiquitin-proteasome pathway. Role of the transcription activation and DNA binding of AhR. *J Biol Chem.* (2000) **275**(12):8432-8.
- Ma Q. Induction of CYP1A1. The AhR/DRE paradigm: transcription, receptor regulation, and expanding biological roles. *Curr Drug Metab.* (2001) **2**(2):149-64.
- Malhotra S, Bailey DG, Paine MF, Watkins PB. Seville orange juice-felodipine interaction: comparison with dilute grapefruit juice and involvement of furocoumarins. *Clin Pharmacol Ther.* (2001) **69**(1):14-23.
- Malonne H, Atassi G. DNA topoisomerase targeting drugs: mechanisms of action and perspectives. *Anticancer Drugs.* (1997) **8**(9):811-22.

- Marko D, Schatzle S, Friedel A, Genzlinger A, Zankl H, Meijer L, Eisenbrand G. Inhibition of cyclin-dependent kinase 1 (CDK1) by indirubin derivatives in human tumour cells. *Br J Cancer*. (2001) **84**(2):283-9.
- Martin S, Trechot P, Pouaha J, Barbaud A, Schmutz JL. Methoxypsoralen-induced sleep disorder. *Dermatology*. (2003) **207**(3):341-2.
- Marzano C, Baccichetti F, Carlassare F, Chilin A, Lora S, Bordin F. DNA damage induced by 4,6,8,9-tetramethyl-2H-furo[2,3-h]quinolin-2-one, a new furocoumarin analog: biological consequences. *Photochem Photobiol*. (2000) **71**(3):263-72.
- Mays DC, Camisa C, Cheney P, Pacula CM, Nawoot S, Gerber N. Methoxsalen is a potent inhibitor of the metabolism of caffeine in humans. *Clin Pharmacol Ther*. (1987) **42**(6):621-6.
- Mays DC, Hecht SG, Unger SE, Pacula CM, Climie JM, Sharp DE, Gerber N. Disposition of 8-methoxypsoralen in the rat. Induction of metabolism in vivo and in vitro and identification of urinary metabolites by thermospray mass spectrometry. *Drug Metab Dispos*. (1987) **15**(3):318-28.
- Mays DC, Nawoot S, Hilliard JB, Pacula CM, Gerber N. Inhibition and induction of drug biotransformation in vivo by 8-methoxypsoralen: studies of caffeine, phenytoin and hexobarbital metabolism in the rat. *J Pharmacol Exp Ther*. (1987) **243**(1):227-33.
- Mays DC, Hilliard JB, Wong DD, Gerber N. Activation of 8-methoxypsoralen by cytochrome P-450. Enzyme kinetics of covalent binding and influence of inhibitors and inducers of drug metabolism. *Biochem Pharmacol*. (1989) **38**(10):1647-55.
- Mays DC, Hilliard JB, Wong DD, Chambers MA, Park SS, Gelboin HV, Gerber N. Bioactivation of 8-methoxypsoralen and irreversible inactivation of cytochrome P-450 in mouse liver microsomes: modification by monoclonal antibodies, inhibition of drug metabolism and distribution of covalent adducts. *J Pharmacol Exp Ther*. (1990) **254**(2):720-31.
- McSorley LC, Daly AK. Identification of human cytochrome P450 isoforms that contribute to all-trans-retinoic acid 4-hydroxylation. *Biochem Pharmacol*. (2000) **60**(4):517-26.
- Merchant M, Arellano L, Safe S. The mechanism of action of alpha-naphthoflavone as an inhibitor of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced CYP1A1 gene expression. *Arch Biochem Biophys*. (1990) **281**(1):84-9.

- Merchant M, Krishnan V, Safe S. Mechanisms of action of alpha-naphthoflavone as an Ah receptor antagonist in MCF-7 human breast cancer cells. *Toxicol Appl Pharmacol.* (1993) **120**(2):179-85.
- Merchant M, Safe S. In vitro inhibition of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced activity by alpha-naphthoflavone and 6-methyl-1,3,8-trichlorodibenzofuran using an aryl hydrocarbon (Ah)-responsive construct. *Biochem Pharmacol.* (1995) **50**(5):663-8.
- Meyer BK, Pray-Grant MG, Vanden Heuvel JP, Perdew GH. Hepatitis B virus X-associated protein 2 is a subunit of the unliganded aryl hydrocarbon receptor core complex and exhibits transcriptional enhancer activity. *Mol Cell Biol.* (1998) **18**(2):978-88.
- Meyer BK, Petrulis JR, Perdew GH. Aryl hydrocarbon (Ah) receptor levels are selectively modulated by hsp90-associated immunophilin homolog XAP2. *Cell Stress Chaperones.* (2000) **5**(3):243-54.
- Midden WR. Chemical mechanisms of the bioeffects of furocoumarins: the role of reactions with proteins, lipids and other cellular constituents. In *Psoralen-DNA Photobiology* (ED. Gasparro FP). CRC Press, Boca Raton, FL. (1988) **2**:1-49.
- Miller CA. Expression of the human aryl hydrocarbon receptor complex in yeast. Activation of transcription by indole compounds. *J Biol Chem.* (1997) **272**(52):32824-9.
- Miller CA. A human aryl hydrocarbon receptor signaling pathway constructed in yeast displays additive responses to ligand mixtures. *Toxicol Appl Pharmacol.* (1999) **160**(3):297-303.
- Mimura J, Ema M, Sogawa K, Fujii-Kuriyama Y. Identification of a novel mechanism of regulation of Ah (dioxin) receptor function. *Genes Dev.* (1999) **13**(1):20-5.
- Mimura J, Fujii-Kuriyama Y. Functional role of AhR in the expression of toxic effects by TCDD. *Biochim Biophys Acta.* (2003) **1619**(3):263-8.
- Mongeau R, Brassard R, Cerkauskas R, Chiba M, Lok E, Nera EA, Jee P, McMullen E, Clayson DB. Effect of addition of dried healthy or diseased parsnip root tissue to a modified AIN-76A diet on cell proliferation and histopathology in the liver, oesophagus and forestomach of male Swiss Webster mice. *Food Chem Toxicol.* (1994) **32**(3):265-71.
- Moran JH, Schnellmann RG. A rapid beta-NADH-linked fluorescence assay for lactate dehydrogenase in cellular death. *J Pharmacol Toxicol Methods.* (1996) **36**(1):41-4.

- Mufti NA, Shuler ML. Induction of cytochrome P-450IA1 activity in response to sublethal stresses in microcarrier-attached Hep G2 cells. *Biotechnol Prog.* (1995) **11**(6):659-63.
- Mufti NA, Shuler ML. Possible role of arachidonic acid in stress-induced cytochrome P450IA1 activity. *Biotechnol Prog.* (1996) **12**(6):847-54.
- Mullen MP, Pathak MA, West JD, Harrist TJ, Dall'Acqua F. Carcinogenic effects of mono-functional and bifunctional furocoumarins. *Natl Cancer Inst Monogr.* (1984) **66**:205-10.
- Nebert DW, Puga A, Vasiliou V. Role of the Ah receptor and the dioxin-inducible [Ah] gene battery in toxicity, cancer, and signal transduction. *Ann N Y Acad Sci.* (1993) **685**:624-40.
- Nebert DW, McKinnon RA. Cytochrome P450: evolution and functional diversity. *Prog Liver Dis.* (1994) **12**:63-97.
- Nebert DW. Drug metabolism and signal transduction: possible role of Ah receptor and arachidonic acid cascade in protection from ethanol toxicity. *EXS.* (1994) **71**:231-40.
- Nebert DW. Drug-metabolizing enzymes in ligand-modulated transcription. *Biochem Pharmacol.* (1994) **47**(1):25-37.
- Nebert DW, Roe AL, Dieter MZ, Solis WA, Yang Y, Dalton TP. Role of the aromatic hydrocarbon receptor and [Ah] gene battery in the oxidative stress response, cell cycle control, and apoptosis. *Biochem Pharmacol.* (2000) **59**(1):65-85.
- Nebert DW, Dalton TP, Okey AB, Gonzalez FJ. Role of aryl hydrocarbon receptor-mediated induction of the CYP1 enzymes in environmental toxicity and cancer. *J Biol Chem.* (2004) **279**(23):23847-50.
- Nie M, Blankenship AL, Giesy JP. Interactions between aryl hydrocarbon receptor (AhR) and hypoxia signaling pathways. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* (2001) **10**(1-2):17-27.
- Ohnishi A, Matsuo H, Yamada S, Takanaga H, Morimoto S, Shoyama Y, Ohtani H, Sawada Y. Effect of furanocoumarin derivatives in grapefruit juice on the uptake of vinblastine by Caco-2 cells and on the activity of cytochrome P450 3A4. *Br J Pharmacol.* (2000) **130**(6):1369-77.
- Okamoto T, Mitsuhashi M, Fujita I, Sindhu RK, Kikkawa Y. Induction of cytochrome P450 1A1 and 1A2 by hyperoxia. *Biochem Biophys Res Commun.* (1993) **197**(2):878-85.

- Okey AB, Riddick DS, Harper PA. Molecular biology of the aromatic hydrocarbon (dioxin) receptor. *Trends Pharmacol Sci.* (1994) **15**(7):226-32.
- Okey AB, Riddick DS, Harper PA. The Ah receptor: mediator of the toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) and related compounds. *Toxicol Lett.* (1994) **70**(1):1-22.
- Osheroff N. Biochemical basis for the interactions of type I and type II topoisomerases with DNA. *Pharmacol Ther.* (1989) **41**(1-2):223-41.
- Ostertag E, Becker T, Ammon J, Bauer-Aymanns H, Schrenk D. Effects of storage conditions on furocoumarin levels in intact, chopped, or homogenized parsnips. *J Agric Food Chem.* (2002) **50**(9):2565-70.
- Paine AJ, Francis JE. The induction of benzo[a]pyrene-3-mono-oxygenase by singlet oxygen in liver cell culture is mediated by oxidation products of histidine. *Chem Biol Interact.* (1980) **30**(3):343-53.
- Park JY, Shigenaga MK, Ames BN. Induction of cytochrome P4501A1 by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin or indolo(3,2-b)carbazole is associated with oxidative DNA damage. *Proc Natl Acad Sci USA.* (1996) **93**(6):2322-7.
- Perdew GH, Babbs CF. Production of Ah receptor ligands in rat fecal suspensions containing tryptophan or indole-3-carbinol. *Nutr Cancer.* (1991) **16**(3-4):209-18.
- Peters JM, Wiley LM. Evidence that murine preimplantation embryos express aryl hydrocarbon receptor. *Toxicol Appl Pharmacol.* (1995) **134**(2):214-21.
- Petersen RA, Niamsup H, Berenbaum MR, Schuler MA. Transcriptional response element in the promotor of *CYP6B1*, an insect P450 gene regulated by plant chemicals. *Biochem Biophys Acta.* (2003) **1619**: 269-82.
- Petrulis JR, Perdew GH. The role of chaperone proteins in the aryl hydrocarbon receptor core complex. *Chem Biol Interact.* (2002) **141**(1-2):25-40.
- Petrulis JR, Kusnadi A, Ramadoss P, Hollingshead B, Perdew GH. The hsp90 Co-chaperone XAP2 alters importin beta recognition of the bipartite nuclear localization signal of the Ah receptor and represses transcriptional activity. *J Biol Chem.* (2003) **278**(4):2677-85.

- Pfeffer B. Festphasenextraktion und Analyse durch EROD-Assay von Tryptophan-Fermentationen mit Rattenfäces. Universität Kaiserslautern, Forschungsarbeit. (2001)
- Phelan D, Winter GM, Rogers WJ, Lam JC, Denison MS. Activation of the Ah receptor signal transduction pathway by bilirubin and biliverdin. *Arch Biochem Biophys.* (1998) **357**(1):155-63.
- Phelan DM, Brackney WR, Denison MS. The Ah receptor can bind ligand in the absence of receptor-associated heat-shock protein 90. *Arch Biochem Biophys.* (1998) **353**(1):47-54.
- Pirkle JL, Wolfe WH, Patterson DG, Needham LL, Michalek JE, Miner JC, Peterson MR, Phillips DL. Estimates of the half-life of 2,3,7,8 tetrachlorodibenzo-p-dioxin in Vietnam Veterans of Operation Ranch Hand. *J Toxicol Environ Health.* (1989) **27**(2):165-71.
- Pitot HC, Peraino C, Morse PA Jr, Potter VR. Hepatomas in tissue culture compared with adapting liver in vivo. *Natl Cancer Inst Monogr.* 1964 **13**:229-45.
- Poellinger L, Kurl RN, Lund J, Gillner M, Carlstedt-Duke J, Hogberg B, Gustafsson JA. High-affinity binding of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in cell nuclei from rat liver. *Biochim Biophys Acta.* (1982) **714**(3):516-23.
- Pohjanvirta R, Korkalainen M, McGuire J, Simanainen U, Juvonen R, Tuomisto JT, Unkila M, Viluksela M, Bergman J, Poellinger L, Tuomisto J. Comparison of acute toxicities of indolo[3,2-b]carbazole (ICZ) and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in TCDD-sensitive rats. *Food Chem Toxicol.* (2002) **40**(7):1023-32.
- Pohl RJ, Fouts JR. A rapid method for assaying the metabolism of 7-ethoxyresorufin by microsomal subcellular fractions. *Anal Biochem.* (1980) **107**(1):150-5.
- Poland A, Glover E, Kende AS. Stereospecific, high affinity binding of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin by hepatic cytosol. Evidence that the binding species is receptor for induction of aryl hydrocarbon hydroxylase. *J Biol Chem.* (1976) **251**(16):4936-46.
- Poland A, Glover E, Ebetino H, Kende A. Photoaffinity labelling of the Ah receptor. *Food Chem Toxicol.* (1986) **24**(6-7):781-7.
- Pollenz RS, Sattler CA, Poland A. The aryl hydrocarbon receptor and aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator protein show distinct subcellular localizations in Hepa 1c1c7 cells by immunofluorescence microscopy. *Mol Pharmacol.* (1994) **45**(3):428-38.

- Pollenz RS. The aryl-hydrocarbon receptor, but not the aryl-hydrocarbon receptor nuclear translocator protein, is rapidly depleted in hepatic and nonhepatic culture cells exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Mol Pharmacol.* (1996) **49**(3):391-8.
- Pollenz RS. The mechanism of AH receptor protein down-regulation (degradation) and its impact on AH receptor-mediated gene regulation. *Chem Biol Interact.* (2002) **141**(1-2):41-61.
- Pongratz I, Antonsson C, Whitelaw ML, Poellinger L. Role of the PAS domain in regulation of dimerization and DNA binding specificity of the dioxin receptor. *Mol Cell Biol.* (1998) **18**(7):4079-88.
- Pratt WB. The role of the hsp90-based chaperone system in signal transduction by nuclear receptors and receptors signaling via MAP kinase. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* (1997) **37**:297-326.
- Puga A, Xia Y, Elferink C. Role of the aryl hydrocarbon receptor in cell cycle regulation. *Chem Biol Interact.* (2002) **141**(1-2):117-30.
- Racky J, Schmitz HJ, Kauffmann HM, Schrenk D. Single nucleotide polymorphism analysis and functional characterization of the human Ah receptor (AhR) gene promoter. *Arch Biochem Biophys.* (2004) **421**(1):91-8.
- Ramaswamy S. Psoralens in food. *Indian Food Packer.* (1975) **29**:37-46
- Rannug A, Rannug U, Rosenkranz HS, Winqvist L, Westerholm R, Agurell E, Grafstrom AK. Certain photooxidized derivatives of tryptophan bind with very high affinity to the Ah receptor and are likely to be endogenous signal substances. *J Biol Chem.* (1987) **262**(32):15422-7.
- Rannug U, Agurell E, Rannug A, Cederberg H. Certain tryptophan photoproducts are inhibitors of cytochrome P450-dependent mutagenicity. *Environ Mol Mutagen.* (1992) **20**(4):289-96.
- Rannug U, Rannug A, Sjoberg U, Li H, Westerholm R, Bergman J. Structure elucidation of two tryptophan-derived, high affinity Ah receptor ligands. *Chem Biol.* (1995) **2**(12):841-5.
- RayChaudhuri B, Nebert DW, Puga A. The murine Cyp1a-1 gene negatively regulates its own transcription and that of other members of the aromatic hydrocarbon-responsive [Ah] gene battery. *Mol Endocrinol.* (1990) **4**(12):1773-81.

- Renwick AB, Mistry H, Barton PT, Mallet F, Price RJ, Beaman JA, Lake BG. Effect of some indole derivatives on xenobiotic metabolism and xenobiotic induced toxicity in cultured rat liver slices. *Food Chem Toxicol.* (1999) **37**(6):609-18.
- Reuber MD. A transplantable bile-secreting hepatocellular carcinoma in the rat. *J Natl Cancer Inst.* (1961) **26**:891-9.
- Reyes H, Reisz-Porszasz S, Hankinson O. Identification of the Ah receptor nuclear translocator protein (Arnt) as a component of the DNA binding form of the Ah receptor. *Science.* (1992) **256**(5060):1193-5.
- Riby JE, Feng C, Chang YC, Schaldach CM, Firestone GL, Bjeldanes LF. The major cyclic trimeric product of indole-3-carbinol is a strong agonist of the estrogen receptor signaling pathway. *Biochemistry.* (2000) **39**(5):910-8.
- Rivera SP, Saarikoski ST, Hankinson O. Identification of a novel dioxin-inducible cytochrome P450. *Mol Pharmacol.* (2002) **61**(2):255-9.
- Robertson JA, Nebert DW, Hankinson O. Autoregulation plus positive and negative elements controlling transkription of genes in the [Ah] battery. *Chem Scripta* (1987) **27A**:83-7.
- Rowlands JC, Gustafsson JA. Aryl hydrocarbon receptor-mediated signal transduction. *Crit Rev Toxicol.* (1997) **27**(2):109-34.
- Sadek CM, Allen-Hoffmann BL. Suspension-mediated induction of Hepa 1c1c7 Cyp1a-1 expression is dependent on the Ah receptor signal transduction pathway. *J Biol Chem.* (1994) **269**(50):31505-9.
- Safe S, Krishnan V. Cellular and molecular biology of aryl hydrocarbon (Ah) receptor-mediated gene expression. *Arch Toxicol Suppl.* (1995) **17**:99-115.
- Safe S, Wang F, Porter W, Duan R, McDougal A. Ah receptor agonists as endocrine disruptors: antiestrogenic activity and mechanisms. *Toxicol Lett.* (1998) **102-103**:343-7.
- Safe S, Wormke M, Samudio I. Mechanisms of inhibitory aryl hydrocarbon receptor-estrogen receptor crosstalk in human breast cancer cells. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* (2000) **5**(3):295-306.

Safe S. Molecular biology of the Ah receptor and its role in carcinogenesis. *Toxicol Lett.* (2001) **120**(1-3):1-7.

Safe SH. Modulation of gene expression and endocrine response pathways by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and related compounds. *Pharmacol Ther.* (1995) **67**(2):247-81.

Sahi J, Reyner EL, Bauman JN, Gueneva-Boucheva K, Burleigh JE, Thomas VH. The effect of bergamottin on diazepam plasma levels and P450 enzymes in beagle dogs. *Drug Metab Dispos.* (2002) **30**(2):135-40.

Santostefano M, Merchant M, Arellano L, Morrison V, Denison MS, Safe S. alpha-Naphthoflavone-induced CYP1A1 gene expression and cytosolic aryl hydrocarbon receptor transformation. *Mol Pharmacol.* (1993) **43**(2):200-6.

Sardari S, Mori Y, Horita K, Micetich RG, Nishibe S, Daneshtalab M. Synthesis and antifungal activity of coumarins and angular furanocoumarins. *Bioorg Med Chem.* (1999) **7**(9):1933-40.

Savouret JF, Berdeaux A, Casper RF. The aryl hydrocarbon receptor and its xenobiotic ligands: a fundamental trigger for cardiovascular diseases. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* (2003) **13**(2):104-13.

Schädlich I. Gewinnung und Charakterisierung von Fermentationsansätzen bezüglich ihrer aryl hydrocarbon receptor (AhR) aktivierenden Wirkung. Universität Kaiserslautern, Forschungsarbeit. (2002)

Schaldach CM, Riby J, Bjeldanes LF. Lipoxin A4: a new class of ligand for the Ah receptor. *Biochemistry.* (1999) **38**(23):7594-600.

Scheel J, Schrenk D. Genomic structure of the human Ah receptor nuclear translocator gene (hARNT). *Hum Genet.* (2000) **107**(4):397-9.

Scheel J, Hussong R, Schrenk D, Schmitz HJ. Variability of the human aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT) gene. *J Hum Genet.* (2002) **47**(5):217-24.

Schimmer O, Abel G. Mutagenicity of a furocoumarin epoxide, heraclenin, in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Mutat Res.* (1986) **169**(1-2):47-50.

Schlatter J. Die toxikologische Bedeutung von Furocumarinen in pflanzlichen Lebensmitteln. *Mitt Gebiete Lebensm Hyg.* (1988) **79**:130-43.

Schmidt M. Einfluß von Furocumarinen auf die Cytochrom P450 1A Aktivität in Rattenhepatozyten. Universität Kaiserslautern, Forschungsarbeit. (2002)

Schmid J, Prox A, Reuter A, Zipp H, Koss FW. The metabolism of 8-methoxypsoralen in man. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet.* (1980) **5**(2):81-92.

Schmid J, Prox A, Zipp H, Koss FW. The use of stable isotopes to prove the saturable first-pass effect of methoxsalen. *Biomed Mass Spectrom.* (1980) **7**(11-12):560-4.

Schmidt JV, Bradfield CA. Ah receptor signaling pathways. *Annu Rev Cell Dev Biol.* (1996) **12**:55-89.

Schmidt JV, Su GH, Reddy JK, Simon MC, Bradfield CA. Characterization of a murine Ahr null allele: involvement of the Ah receptor in hepatic growth and development. *Proc Natl Acad Sci USA.* (1996) **93**(13):6731-6.

Schmiedlin-Ren P, Edwards DJ, Fitzsimmons ME, He K, Lown KS, Woster PM, Rahman A, Thummel KE, Fisher JM, Hollenberg PF, Watkins PB. Mechanisms of enhanced oral availability of CYP3A4 substrates by grapefruit constituents. Decreased enterocyte CYP3A4 concentration and mechanism-based inactivation by furanocoumarins. *Drug Metab Dispos.* (1997) **25**(11):1228-33.

Schmitt IM, Chimenti S, Gasparro FP. Psoralen-protein photochemistry--a forgotten field. *J Photochem Photobiol B.* (1995) **27**(2):101-7.

Schmitz HJ. Enzyminduzierende Wirkung umweltrelevanter Gemische polychlorierter Biphenyle (PCB) in Zellkulturen der Ratte. Eberhard-Karls-Universität Tübingen, Diplomarbeit. (1994)

Schmitz HJ, Hagenmaier A, Hagenmaier HP, Bock KW, Schrenk D. Potency of mixtures of polychlorinated biphenyls as inducers of dioxin receptor-regulated CYP1A activity in rat hepatocytes and H4IIE cells. *Toxicology.* (1995) **99**(1-2):47-54.

Schneiders N. Etablierung des Dioxin-abhängigen Cytochrom-P450-1A-Enzymassays (EROD) im Multiwell-Verfahren mit Kulturen der Ratten-Hepatoma-Zelllinie H4IIE. Universität Kaiserslautern, Forschungsarbeit. (2001)

Schrenk D, Stuvén T, Gohl G, Viebahn R, Bock KW. Induction of CYP1A and glutathione S-transferase activities by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in human hepatocyte cultures. *Carcinogenesis*. (1995) **16**(4):943-6.

Schrenk D, Riebniger D, Till M, Vetter S, Fiedler HP. Tryptanthrins: a novel class of agonists of the aryl hydrocarbon receptor. *Biochem Pharmacol*. (1997) **54**(1):165-71.

Schrenk D. Impact of dioxin-type induction of drug-metabolizing enzymes on the metabolism of endo- and xenobiotics. *Biochem Pharmacol*. (1998) **55**(8):1155-62.

Schrenk D, Brockmeier D, Morike K, Bock KW, Eichelbaum M. A distribution study of CYP1A2 phenotypes among smokers and non-smokers in a cohort of healthy Caucasian volunteers. *Eur J Clin Pharmacol*. (1998) **53**(5):361-7.

Schrenk D, Riebniger D, Till M, Vetter S, Fiedler HP. Tryptanthrins and other tryptophan-derived agonists of the dioxin receptor. *Adv Exp Med Biol*. (1999) **467**:403-8.

Schrenk D, Schmitz HJ, Bohnenberger S, Wagner B, Worner W. Tumor promoters as inhibitors of apoptosis in rat hepatocytes. *Toxicol Lett*. (2004) **149**(1-3):43-50.

Seglen PO. Preparation of isolated rat liver cells. *Methods Cell Biol*. (1976) **13**:29-83.

Seidel SD, Winters GM, Rogers WJ, Ziccardi MH, Li V, Keser B, Denison MS. Activation of the Ah receptor signaling pathway by prostaglandins. *J Biochem Mol Toxicol*. (2001) **15**(4):187-96.

Seki T, Nozu K, Kondo S. Differential causes of mutation and killing in *Escherichia coli* after psoralen plus light treatment: monoadducts and cross-links. *Photochem Photobiol*. (1978) **27**(1):19-24.

Shephard SE, Langguth P, Panizzon RG. Pharmacokinetic behaviour of sublingually administered 8-methoxypsoralen for PUVA therapy. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. (2001) **17**(1):11-21.

Shertzer HG, Puga A, Chang C, Smith P, Nebert DW, Setchell KD, Dalton TP. Inhibition of CYP1A1 enzyme activity in mouse hepatoma cell culture by soybean isoflavones. *Chem Biol Interact*. (1999) **123**(1):31-49.

- Shiotani B, Nonaka Y, Hashimoto T, Kihara K, Kanazawa K, Danno G, Ashida H. DNA-damaging carcinogen 3-amino-1,4-dimethyl-5H-pyrido[4,3-b]indole (Trp-P-1) induces apoptosis via caspase-9 in primary cultured rat hepatocytes. *Carcinogenesis*. (2001) **22**(5):693-700.
- Siess MH, Pennec A, Gaydou E. Inhibition of ethoxy- and pentoxy-resorufin dealkylases of rat liver by flavones and flavonols: structure-activity relationship. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*. (1989) **14**(3):235-9.
- Sinal CJ, Bend JR. Aryl hydrocarbon receptor-dependent induction of cyp1a1 by bilirubin in mouse hepatoma hepa 1c1c7 cells. *Mol Pharmacol*. (1997) **52**(4):590-9.
- Sindhu RK, Mitsuhashi M, Kikkawa Y. Induction of cytochrome P-450 1A2 by oxidized tryptophan in Hepa 1c1c7 cells. *J Pharmacol Exp Ther*. (2000) **292**(3):1008-14.
- Sogawa K, Fujii-Kuriyama Y. Ah receptor, a novel ligand-activated transcription factor. *J Biochem (Tokyo)*. (1997) **22**(6):1075-9.
- Song J, Clagett-Dame M, Peterson RE, Hahn ME, Westler WM, Sicinski RR, DeLuca HF. A ligand for the aryl hydrocarbon receptor isolated from lung. *Proc Natl Acad Sci USA*. (2002) **99**(23):14694-9.
- Song PS, Mantulin WW, McInturff D, Felkner IC, Harter ML. Photoreactivity of hydroxyp-soralens and their photobiological effects in *Bacillus subtilis*. *Photochem Photobiol*. (1975) **21**(5):317-24.
- Song Z, Pollenz RS. Ligand-dependent and independent modulation of aryl hydrocarbon receptor localization, degradation, and gene regulation. *Mol Pharmacol*. (2002) **62**(4):806-16.
- Soprano DR, Soprano KJ. Pharmacological doses of some synthetic retinoids can modulate both the aryl hydrocarbon receptor and retinoid receptor pathways. *J Nutr*. (2003) **133**(1):277S-81S.
- Spink BC, Hussain MM, Katz BH, Eisele L, Spink DC. Transient induction of cytochromes P450 1A1 and 1B1 in MCF-7 human breast cancer cells by indirubin. *Biochem Pharmacol*. (2003) **66**(12):2313-21.

- Staack R, Kingston S, Wallig MA, Jeffery EH. A comparison of the individual and collective effects of four glucosinolate breakdown products from brussels sprouts on induction of detoxification enzymes. *Toxicol Appl Pharmacol.* (1998) **149**(1):17-23.
- Stephensen PU, Bonnesen C, Schaldach C, Andersen O, Bjeldanes LF, Vang O. N-methoxyindole-3-carbinol is a more efficient inducer of cytochrome P-450 1A1 in cultured cells than indol-3-carbinol. *Nutr Cancer.* (2000) **36**(1):112-21.
- Stern RS, Liebman EJ, Vakeva L. Oral psoralen and ultraviolet-A light (PUVA) treatment of psoriasis and persistent risk of nonmelanoma skin cancer. PUVA Follow-up Study. *J Natl Cancer Inst.* (1998) **90**(17):1278-84.
- Stern RS. Photocarcinogenicity of drugs. *Toxicol Lett.* (1998) **102-103**:389-92.
- Stern RS. PUVA Follow up Study. The risk of melanoma in association with long-term exposure to PUVA. *J Am Acad Dermatol.* (2001) **44**(5):755-61.
- Stern RS, Bagheri S, Nichols K. PUVA Follow Up Study. The persistent risk of genital tumors among men treated with psoralen plus ultraviolet A (PUVA) for psoriasis. *J Am Acad Dermatol.* (2002) **47**(1):33-9.
- Stern RS. Actinic degeneration and pigmentary change in association with psoralen and UVA treatment: a 20-year prospective study. *J Am Acad Dermatol.* (2003) **48**(1):61-7.
- Stolk LM, Siddiqui AH, Westerhof W, Cormane RH. Comparison of bioavailability and phototoxicity of two oral preparations of 5-methoxypsoralen. *Br J Dermatol.* (1985) **112**(4):469-73.
- Sullivan TJ, Walter JL, Kouba RF, Maiwald DC. Bioavailability of a new oral methoxsalen formulation. A serum concentration and photosensitivity response study. *Arch Dermatol.* (1986) **122**(7):768-71.
- Swanson HI, Bradfield A. The Ah-receptor: genetics, structure and function. *Pharmacogenetics.* (1993) **3**:213-230.
- Szutowski MM, Lukasik M, Wawer ZT, Chrobak K, Michalska M, Borzecka K, Brzezinski J. In vivo effect of 5- and 8-methoxypsoralens and cimetidine on R,S-warfarin metabolism in rat. *J Appl Toxicol.* (2002) **22**(5):327-32.

- Taavitsainen P, Juvonen R, Pelkonen O. In vitro inhibition of cytochrome P450 enzymes in human liver microsomes by a potent CYP2A6 inhibitor, trans-2-phenylcyclopropylamine (trans-cyclopropylamine), and its nonamine analog, cyclopropylbenzene. *Drug Metab Dispos.* (2001) **29**(3):217-22.
- Takahashi N, Dashwood RH, Bjeldanes LF, Bailey GS, Williams DE. Regulation of hepatic cytochrome P4501A by indole-3-carbinol: transient induction with continuous feeding in rainbow trout. *Food Chem Toxicol.* (1995) **33**(2):111-20.
- Takahashi N, Stresser DM, Williams DE, Bailey GS. Induction of hepatic CYP1A by indole-3-carbinol in protection against aflatoxin B1 hepatocarcinogenesis in rainbow trout. *Food Chem Toxicol.* (1995) **33**(10):841-50.
- Takahashi Y, Nakayama K, Shimojima T, Itoh S, Kamataki T. Expression of aryl hydrocarbon receptor (AhR) and aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (Arnt) in adult rabbits known to be non-responsive to cytochrome P-450 1A1 (CYP1A1) inducers. *Eur J Biochem.* (1996) **15**;242(3):512-8.
- Takahashi Y, Nakayama K, Itoh S, Kamataki T. Upstream stimulatory factor 1(USF1) suppresses induction of CYP1A1 mRNA by 3-methylcholanthrene (MC) in HepG2 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* (1997) **240**(2):293-7.
- Takeuchi H, Saoo K, Yokohira M, Ikeda M, Maeta H, Miyazaki M, Yamazaki H, Kamataki T, Imaida K. Pretreatment with 8-methoxypsoralen, a potent human CYP2A6 inhibitor, strongly inhibits lung tumorigenesis induced by 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone in female A/J mice. *Cancer Res.* (2003) **63**(22):7581-3.
- Tan Z, Chang X, Puga A, Xia Y. Activation of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) by aromatic hydrocarbons: role in the regulation of aryl hydrocarbon receptor (AHR) function. *Biochem Pharmacol.* (2002) **64**(5-6):771-80.
- Tantcheva-Poor I, Servera-Llaneras M, Scharffetter-Kochanek K, Fuhr U. Liver cytochrome P450 CYP1A2 is markedly inhibited by systemic but not by bath PUVA in dermatological patients. *Br J Dermatol.* (2001) **144**(6):1127-32.
- Tassaneeyakul W, Guo LQ, Fukuda K, Ohta T, Yamazoe Y. Inhibition selectivity of grapefruit juice components on human cytochromes P450. *Arch Biochem Biophys.* (2000) **378**(2):356-63.

Till M. Evaluierung eines Bioassays zur Erfassung von 'dioxinartiger' Potenz in Industrie- und Umweltproben und Screening nach natürlichen Liganden des Ah-Rezeptors. Eberhard-Karls-Universität Tübingen, Dissertation. (1998)

Till M, Riebinger D, Schmitz HJ, Schrenk D. Potency of various polycyclic aromatic hydrocarbons as inducers of CYP1A1 in rat hepatocyte cultures. *Chem Biol Interact.* (1999) **117**(2):135-50.

Tinel M, Belghiti J, Descatoire V, Amouyal G, Letteron P, Geneve J, Larrey D, Pessayre D. Inactivation of human liver cytochrome P-450 by the drug methoxsalen and other psoralen derivatives. *Biochem Pharmacol.* (1987) **36**(6):951-5.

Tithof PK, Schiamberg E, Peters-Golden M, Ganey PE. Phospholipase A2 is involved in the mechanism of activation of neutrophils by polychlorinated biphenyls. *Environ Health Perspect.* (1996) **104**(1):52-8.

Tscheudschilsuren G, Hombach-Klonisch S, Kuchenhoff A, Fischer B, Klonisch T. Expression of the arylhydrocarbon receptor and the arylhydrocarbon receptor nuclear translocator during early gestation in the rabbit uterus. *Toxicol Appl Pharmacol.* (1999) **160**(3):231-7.

Ulrichova J, Dvorak Z, Vicar J, Lata J, Smrzova J, Sedo A, Simanek V. Cytotoxicity of natural compounds in hepatocyte cell culture models. The case of quaternary benzo[c]phenanthridine alkaloids. *Toxicol Lett.* (2001) **125**:125-32

van den Berg M, Peterson RE, Schrenk D. Human risk assessment and TEFs. *Food Addit Contam.* (2000) **17**(4):347-58.

van Leeuwen FX, Feeley M, Schrenk D, Larsen JC, Farland W, Younes M. Dioxins: WHO's tolerable daily intake (TDI) revisited. *Chemosphere.* (2000) **40**(9-11):1095-101.

Vecchini F, Lenoir-Viale MC, Cathelineau C, Magdalou J, Bernard BA, Shroot B. Presence of a retinoid responsive element in the promoter region of the human cytochrome P4501A1 gene. *Biochem Biophys Res Commun.* (1994) **201**(3):1205-12.

Wagstaff DJ. Dietary exposure to furocoumarins. *Regul Toxicol Pharmacol.* (1991) **14**(3):261-72.

Wang EJ, Casciano CN, Clement RP, Johnson WW. Inhibition of P-glycoprotein transport function by grapefruit juice psoralen. *Pharm Res.* (2001) **18**(4):432-8.

- Wang JC. DNA topoisomerases. *Annu Rev Biochem.* (1985) **54**:665-97.
- Watanabe T, Imoto I, Kosugi Y, Fukuda Y, Mimura J, Fujii Y, Isaka K, Takayama M, Sato A, Inazawa J. Human arylhydrocarbon receptor repressor (AHRR) gene: genomic structure and analysis of polymorphism in endometriosis. *J Hum Genet.* (2001) **46**(6):342-6.
- Wei YD, Rannug U, Rannug A. UV-induced CYP1A1 gene expression in human cells is mediated by tryptophan. *Chem Biol Interact.* (1999) **118**(2):127-40.
- Wei YD, Bergander L, Rannug U, Rannug A. Regulation of CYP1A1 transcription via the metabolism of the tryptophan-derived 6-formylindolo[3,2-b]carbazole. *Arch Biochem Biophys.* (2000) **383**(1):99-107.
- Wen YH, Sahi J, Urda E, Kulkarni S, Rose K, Zheng X, Sinclair JF, Cai H, Strom SC, Kostrubsky VE. Effects of bergamottin on human and monkey drug-metabolizing enzymes in primary cultured hepatocytes. *Drug Metab Dispos.* (2002) **30**(9):977-84.
- Werlinder V, Backlund M, Zhukov A, Ingelman-Sundberg M. Transcriptional and post-translational regulation of CYP1A1 by primaquine. *J Pharmacol Exp Ther.* (2001) **297**(1):206-14.
- Whitlock JP Jr. The regulation of gene expression by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Pharmacol Rev.* (1987) **39**:147-61.
- Whitlock JP Jr, Okino ST, Dong L, Ko HP, Clarke-Katzenberg R, Ma Q, Li H. Cytochromes P450 5: induction of cytochrome P4501A1: a model for analyzing mammalian gene transcription. *FASEB J.* (1996) **10**(8):809-18.
- Whitlock JP Jr. Induction of cytochrome P4501A1. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* (1999) **39**:103-25.
- Wilson CL, Safe S. Mechanisms of ligand-induced aryl hydrocarbon receptor-mediated biochemical and toxic responses. *Toxicol Pathol.* (1998) **26**(5):657-71.
- Wormke M, Stoner M, Saville B, Safe S. Crosstalk between estrogen receptor alpha and the aryl hydrocarbon receptor in breast cancer cells involves unidirectional activation of proteasomes. *FEBS Lett.* (2000) **478**(1-2):109-12.

Xu L, Li AP, Kaminski DL, Ruh MF. 2,3,7,8 Tetrachlorodibenzo-p-dioxin induction of cytochrome P4501A in cultured rat and human hepatocytes. *Chem Biol Interact.* (2000) **124**(3):173-89.

Zarebska Z, Waszkowska E, Caffieri S, Dall'Acqua F. PUVA (psoralen + UVA) photochemotherapy: processes triggered in the cells. *Farmaco.* (2000) **55**(8):515-20.

Zeiger M, Haag R, Hockel J, Schrenk D, Schmitz HJ. Inducing effects of dioxin-like polychlorinated biphenyls on CYP1A in the human hepatoblastoma cell line HepG2, the rat hepatoma cell line H4IIE, and rat primary hepatocytes: comparison of relative potencies. *Toxicol Sci.* (2001) **63**(1):65-73.

Zhai S, Dai R, Friedman FK, Vestal RE. Comparative inhibition of human cytochromes P450 1A1 and 1A2 by flavonoids. *Drug Metab Dispos.* (1998) **26**(10):989-92.

Zhang S, Qin C, Safe SH. Flavonoids as aryl hydrocarbon receptor agonists/antagonists: effects of structure and cell context. *Environ Health Perspect.* (2003) **111**(16):1877-82.

Zhang W, Kilicarslan T, Tyndale RF, Sellers EM. Evaluation of methoxsalen, tranlylcypromine, and tryptamine as specific and selective CYP2A6 inhibitors in vitro. *Drug Metab Dispos.* (2001) **29**(6):897-902.

Zhou J, Gasiewicz TA. 3'-methoxy-4'-nitroflavone, a reported aryl hydrocarbon receptor antagonist, enhances Cyp1a1 transcription by a dioxin responsive element-dependent mechanism. *Arch Biochem Biophys.* (2003) **416**(1):68-80.

6 LEBENSLAUF

Persönliche Daten

| | |
|---------------------|--------------------------------|
| Name | Annette Baumgart |
| Geburtsdatum | 06.08.1974 |
| Geburtsort | Kirchheimbolanden |
| Anschrift | Ostring 30 67304 Kerzenheim |
| Staatsangehörigkeit | deutsch |
| Familienstand | ledig |

Schulbildung

| | |
|-----------|---|
| 1981-1985 | Grundschule Kerzenheim |
| 1985-1994 | Staatl. Nordpfalzgymnasium Kirchheimbolanden Abitur im Juni 1994 |

Hochschulausbildung

| | |
|------------------------|---|
| 1994-1999 | Studium der Chemie an der Universität Kaiserslautern |
| April 1997 | Diplomvorprüfung |
| Juni 1999 | Diplomprüfung |
| Juli 1999-Februar 2000 | Diplomarbeit an der Universität Kaiserslautern, Fachbereich Chemie, Fachrichtung Lebensmittelchemie und Umweltoxikologie in der Arbeitsgruppe von Prof. Schrenk zum Thema: <i>Indol-Derivate als Ah (aryl hydrocarbon)-Rezeptor-Liganden</i> |
| seit Februar 2000 | Promotion an der Universität Kaiserslautern, Fachbereich Chemie, Fachrichtung Lebensmittelchemie und Umweltoxikologie in der Arbeitsgruppe von Prof. Schrenk zum Thema: <i>Untersuchung zur Wirkung natürlicher Liganden des `a-ryl hydrocarbon´-Rezeptors (AhR)</i> |